

⑨ 日本国特許庁(J・P)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

昭62-500631

⑬ 公表 昭和62年(1987)3月19日

⑭ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

C 12 P 21/02
A 61 K 37/02
C 07 H 21/04

ADU

6712-4B
7138-4C
7306-4C※

予備審査請求 未請求

部門(区分) 1(1)

(全 22 頁)

⑯ 発明の名称 ヒト腫瘍壊死因子

⑰ 特 願 昭60-504592

⑱ 翻訳文提出日 昭61(1986)6月13日

⑲ 出 願 昭60(1985)10月3日

⑳ 国際出願 PCT/US85/01921

㉑ 国際公開番号 WO86/02381

㉒ 国際公開日 昭61(1986)4月24日

優先権主張 ㉓ 1984年10月15日 ㉔ 米国(US) ㉕ 661026

⑳ 発 明 者 マーク、デビッド エフ

アメリカ合衆国、カリフォルニア 94526, ダンビル, スタンブリ
ッジ コート 217

㉑ 出 願 人 シタス コーポレイション

アメリカ合衆国、カリフォルニア 94608, エミリービル, ファイフ
ティサード ストリート 1400

㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BG, BR, CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域
特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, RO, SE(広域特
許), SU

最終頁に続く

特許(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 組換えヒト腫瘍壊死因子(TNF)。
2. 第1図中位置17-157に示されるアミノ酸配列を含んで成る組換えTNF。
3. 第1図のアミノ酸配列を有する請求の範囲第1項に記載のTNF(mTNF)。
4. システインが除去されたミューテインである請求の範囲第1項に記載のTNF。
5. ▽1-、▽3-、▽4-、▽5-、▽6-、▽8-、▽9-、及び▽10-TNFから成る群から選ばれる請求の範囲第1項に記載のTNF。
6. 次のN-末端配列: Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Ile-Val を有する請求の範囲第1項に記載のTNF。
7. 次のN-末端アミノ酸配列: Val-Arg-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Val-Ser-Val-Ala-Asn-Pro-(Gln)-(Ala)-Glu-Gly を有する請求の範囲第1項に記載のTNF。
8. ヒトTNFをコードする組換えDNA。
9. コードされたTNFが第1図の位置17-157中に示されるアミノ酸配列を含んで成る請求の範囲第8項に記載のDNA。
10. コードされたTNFが第1図のアミノ酸配列(mTNF)を有する請求の範囲第8項に記載のDNA。

11. コードされたTNFがシステインが除去されたミューテインである請求の範囲第8項に記載のDNA。

12. コードされたTNFが▽1-、▽3-、▽4-、▽5-、▽6-、▽8-、▽9-、及び▽10-TNFから成る群からのものである請求の範囲第8項に記載のDNA。

13. コードされたTNFが次のN-末端配列: Ser-Asp-Lys-Pro を有する請求の範囲第8項に記載のDNA。

14. コードされたTNFが次のN-末端アミノ酸配列: Val-Arg-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Val-Ser-Val-Ala-Asn-Pro-(Gln)-(Ala)-Glu-Gly を有する請求の範囲第8項に記載のDNA。

15. 適合性の宿主細胞中で請求の範囲第8項〜第14項のDNAの発現を行うのに効果的な制御配列及びコード配列を含んで成る組換えDNA。

16. 請求の範囲第8項〜第14項のDNAにより形質転換された組換え宿主細胞。

17. 請求の範囲第8項〜第14項のDNAにより形質転換された組換え宿主細胞を培養することを含んで成るヒト組換えTNFの製造方法。

18. 活性成分が請求の範囲第1項〜第7項のTNFである、哺乳動物において腫瘍の壊死を行うのに有用な組成物。

19. 請求の範囲第1項〜第7項に定義する組換えヒト腫瘍壊死因子の抗腫瘍有効量を宿主に投与することによる、腫瘍の治療方法。

特許(内容に変更なし)
明 細 書

ヒト腫瘍壊死因子

技術分野

この発明はヒト蛋白質因子の組換え生産に関する。これは特に、腫瘍に対して選択的に毒性である蛋白質及び比活性について改良されているそのミューテインの製造に関する。

背景技術

腫瘍壊死因子 (TNF) としてよく知られるようになった因子は最初 Carswell 等、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1975) 72: 3666 により見出された。バシルス・カルメッテグリン (*Bacillus Calmette-Guérin*) (BCG) のごく免疫増強剤によりあらかじめ感染されたマウス、ラビット又はラットであってエンドトキシン処理されたものの血清が、移植された腫瘍を担持するマウスに注射された場合に受容者に不所望の副作用を伴わないで該腫瘍の広範な出血を惹起する物質を含有することが見出された。従って、この血清は腫瘍細胞に対して選択的に壊死作用を有しそして正常な組織とのその反応については中立的であり、それ故に TNF と称される物質を含有することが予想された。全体動物に注射された場合にこの選択的な腫瘍破壊を生じさせる能力が TNF を定義する標準的なインビボアッセイ法となった。

TNF はまた細胞培養物中にも生産された。Matthews 等、

等 (前掲) のインビボ法は TNF を定義する標準として承認されている。これらの因子の種間交差活性 (cross species activity) のため、このアッセイ法はある意味において便利で診断的である。しかしながら、細胞毒性についての一層便利なインビトロアッセイ法が TNF 活性の指標としてしばしば使用される。この方法は、このインビトロアッセイ法と TNF を定義する試験との間に 1:1 の相互関係が存在するか否かについてかなりの混乱があるにもかかわらず使用されている。確かに、インビトロアッセイにおいて活性である形質転換された B-セルライン由来の蛋白質が "リンホトキシン" と命名され、均一に精製され、そして部分的に配列決定された (ゼネンテック、ヨーロッパ特許出願公開 No. 0100641、1984 年 2 月 15 日公開)。リンホトキシンは、それが非マクロファージ由来であるため、"TNF" とは異なる蛋白質であると予想されている。さらに、リンホトキシンに対して調製された抗-血清はマクロファージから精製された細胞毒性因子 (TNF) と交差反応しない [Stone-Wolff, D. 等、*J. Exp. Med.* (1984) 159: 828]。

腫瘍細胞に対して特異的に向けられた細胞毒性効果を発現することができる明確にされた蛋白質配列を提供することは、言うまでもなく、悪性疾患の診断及び治療の両者のために大きな利益をもたらすであろう。さらに、これらの因子の幾つかは抗-寄生生活性を有するようであり、BCG を注射されたマウスの血清由来の TNF と称する蛋白質が、インビボ及びインビトロにおいてマラリア寄生体 (プロトゾウム・ファ

特表昭 62-500631 (2)

Brit. J. Cancer (1981) 44: 418 は、BCG 注射されたラビット由来の単核球細胞の培地中に TNF 活性を得ることができた (Mannel 等、*Infect. Immun.* (1980) 30: 523; 同 (1981) 33: 156)。細胞培養後に BCG 感染されたマウスからのマクロファージ富化腹腔腔液細胞から得られる TNF 活性はエンドトキシンにより誘導された。

新生物細胞に対する選択的細胞毒性を担当する因子を精製する試みが行われたが全体動物の血清中又は組織培養培地中に極めて少量のみ存在する様であるため完全な精製を行うことは不可能であった。さらに、蛋白質 (1又は複数) は明らかに不安定であり、そして 2つの最近の米国特許 No. 4,447,355 及び No. 4,457,916 は、例えばアルブミン又は炭水化物材料の添加により調製物の活性を安定化する方法に向けられている。他人によって開発された標準的精製法を用いるこれらの開示の方法においては、約 1×10^4 ユニット/mg の TNF 調製物の比活性を得ることが可能であり、このユニットはネズミ E-M 細胞 (ATCC CCL 1.2) に対する細胞毒性についてのインビトロ・アッセイにおいて定義されたものである。しかしながら、TNF についてのインビボ (Carswell) 腫瘍壊死アッセイにおいて活性であり、且つアミノ酸配列情報を得ることができるために十分な純度を有する材料を得ることは不可能であった。

確かに、純粋な細胞毒性蛋白質が入手不可能であるため、現在のところ、癌細胞に対して選択的な壊死作用を有する蛋白質をいかに多く得ることができるか明らかでない。Carswell

ルシバリウム (*Plasmodium falciparum*) に対して細胞毒的影響を示すことが示されている (Haidans 等、*Infect. Immun.* (1983) 42: 385)。

発明の開示

ヒト前骨髄球性白血病セルライン (HL-60, ATCC No. CCL240) が、適切に誘導された場合、腫瘍壊死因子を有意な量で生産することが示された。この因子が精製され、配列決定され、そして組換え技法によって生産された。従って、第 1 に、ヒト腫瘍細胞に対して選択的に細胞毒性である化学的に定義された因子が存在する。これは、医療において使用するために十分な量の材料を提供し、活性を改良するためにプログラムされた変形を行い、そして生物中の腫瘍の存在を検出するための適切な診断試験を設計する機会をもたらす。すなわち、この蛋白質の組換え源の入手可能性は、この有用なペプチドの治療及び診断のための操作の実施可能性をもたらす。以上の形態の TNF が腫瘍形態にตอบสนองしてヒトによりおそらく天然に生産されるであろうが、組換え生産によりもたらされる柔軟性並びに質及び量の保証がなければ、その性質を利用する手段を手にする事ができない。

従って、1つの観点において、この発明は組換えヒト TNF に関する。他の観点において、これはこの蛋白質をコードする中断されない DNA 配列、その発現を行うことができる配列、形質転換宿主に TNF を発現する能力を付与することができる形質転換ベクター、こうして形質転換された組換え体宿

主、及びこの発明の種々の組成物を得るための方法に関する。

他の観点において、この発明は特にグリコシル化された形又はグリコシル化されていない形の、第1図に示すDNA配列によりコードされるアミノ酸配列の蛋白質に関する。

この発明はまた、第1図に示されるものと比較して一次構造に変化を含有するTNFの幾つかの特定の組換ミューテイン、並びにそれらの製造のための方法及び材料に関する。これらのミューテインは、腫瘍細胞を選択的に殺すそれらの能力において、第1図に示す一次配列のTNF(mTNF)に匹敵し、又はそれより活性が高い。これらのミューテインは、1~10N-末端アミノ酸残基が除去されている対応する蛋白質、及び1~10N-末端アミノ酸が存在せずシステインが除去されているミューテインを包含する。

この発明は特に、N-末端配列: Val-Arg-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Val-Ser-Val-Ala-Asn-Pro-(Gln)-(Ala)-Glu-Gly を有する蛋白質、及び前骨髄球性白血病細胞からこのアミノ酸配列の生座を誘導しそしてそれを精製するための改良された方法に関する。この発明はさらに、TNFを含有する医薬組成物、これらの組成物を使用する治療方法、及びTNFのための改良されたアッセイ方法に関する。

図面の簡単な説明

第1図はpE4の完全スクレオチド配列及びヒトTNFの推定されるアミノ酸配列を示す。

壊死因子としての性質決定が正当化されるに十分な有用性の保証をもたらす。下記のごとく、L-929に対する細胞毒性は他のヒト腫瘍に一般化されるようである。上に特定した細胞毒性アッセイにおいて活性な因子とCarrawellにより要約されているインビボアッセイにおいて活性な因子との間に実質的なオーバーラップが存在すると予想される。

この発明のTNF蛋白質は、懸濁されているか又は溶液であればその環境のpHに依存して、あるいは固体の形であれば結晶化又は沈澱の際のその環境のpHに依存して、医薬として許容される塩の形であることができ、又は中性の形であることができる。この蛋白質の遊離アミノ基は言うまでもなく、例えば無機酸、例えば塩酸、リン酸もしくは硫酸、又は有機酸、例えば酢酸、グリコール酸、コハク酸もしくはマンデル酸と共に酸付加塩を形成することができる。遊離カルボキシル基は、塩基、例えば無機塩基、例えばナトリウム、カリウム又はカルシウムの水酸化物、及び有機酸、例えばピペリジン、グルコサミン、トリメチルアミン、コリン又はカフィインと共に塩を形成することができる。さらに、蛋白質は他の生物学的物質、例えばリビド及びサッカライドとの結合により、又は側鎖修飾、例えばアミノ基のアセチル化、ヒドロキシル基のリン酸化、又はスルヒドリル基の酸化により修飾され得る。TNF活性が保持される限り、これらの修飾のすべてがこの発明の範囲に属する。

最後に、一次アミノ酸配列のある種の変形がなお、第1図に示される配列に比べて実質上同等の又は増強された活性を

第2図はpE4中の挿入部の制限地図を示す。

第3図は発現用プラスミド及び種々のTNFミューテインのためのそれらを造成するために使用されたオリゴマーを示す。

第4図は幾つかのTNFミューテインの比活性の比較を示す。

第5図は精製された組換TNF(rTNF)ミューテインに対して行われたSDSゲルを示す。

第6図は精製されたrTNFミューテインに対して行われた等電点電気泳動ゲルの結果を示す。

第7a図及び第7b図は腫瘍担持マウスにおけるTNF活性のインビボ試験の結果を示す。

発明を実施するための態様

A. 定義

この明細書において使用する場合、"腫瘍壊死因子(TNF)"は、腫瘍細胞に対して選択的細胞毒性であることができ、第1図に示されるものと実質的に同等のアミノ酸配列に関する。この定義に合致するアミノ酸配列は後に記載する連続性ネズミ結合組織セルラインL-929に基づくインビトロ細胞毒性アッセイにおいて活性でなければならない。TNF活性のこの定義は、Carrawell等(前掲)によるこの用語を造り作した開示中に示されているそれとは正確に同一ではない。しかしながら、ヒト腫瘍細胞に対するこのインビトロ細胞毒性アッセイにより確認される活性は、このアッセイを用いる腫瘍

有する蛋白質をもたらすことができることが理解される。これらの変形は、部位特定変異誘発によるごとく意図的であってもよく、又はTNF生産宿主中における変異によるごとく偶然的であってもよい。特定の変形がTNF活性を有する蛋白質を導くであろうことは予想されず、そしてどの変形が許容されるかをあらかじめ予想することはできないが、上記のようにTNF活性が保持されている限りこれらの変形のすべてが"TNF"の定義に含まれる。

特に、第1図に示される配列のN-末端の最初の10個までのアミノ酸(10番目のアミノ酸を含む)を欠くミューテインが示されている構造のTNFに匹敵するか又はそれより高い比活性を有することが見出され、そして後で説明する。比活性のパターンは、6~8個のN-末端アミノ酸が除去された場合に最適活性を伴って、ベル形曲線に従うようである。従って、TNFの定義は特にこれらの切り取られた形態を包含する。明らかに、N-末端からの10個までのアミノ酸の除去は生物学的活性を破壊せず、しかし事実、しばしばそれを増強するからである。

従って、この明細書においてTNFの定義は特に、第1図に示すものと実質上同じアミノ酸配列を有するが、しかしその図中に示されるN-末端配列において1~10個のアミノ酸を欠く蛋白質を包含する。Shirai, T.等、*Nature*(1985) 313: 803-806 が、ヒトゲノムバンクから得られたDNAから造成された発現ベクターを用いて組換TNFを製造したことが注目される。この造成物においては、コードされた蛋白質は

第1図に示されるN-末端配列の最初の2アミノ酸を欠いている。明らかではないがしかしラビットTNFゲノム構造に関連するらしい理由で、Shirai等は、正しいN-末端はこの明細書において示されている位置の3位から始めると予想し、そしてこのために前記ベクターを造成した。その結果、Shiraiにより製造されたTNFはN-末端配列Ser-Ser-Arg-Thr等を有する。Shiraiにより製造されたTNFはインビボ活性を有することが示された。この蛋白質の活性と、この発明の組換え生産されたmTNF及びTNFミューテインのそれとの直接比較は現在のところ得られていない。

さらに、第1図に示すTNFのC-末端からの除去も無害であると予想される。17個までのアミノ酸の除去をコードする遺伝子の造成も行われた。

米国特許No.4,518,584は生物学的に活性な蛋白質のシステインが除去されたミューテインを記載している。TNFの場合においては、69位のシステインの中性アミノ酸による置き換えが活性なTNF蛋白質をもたらす。101位のシステインも不必要なようであり、そしてこの位置にこれに代る中性アミノ酸を有するミューテイン、並びにシステイン69及び101の両者が置き換えられたミューテインも調製された。これらのミューテインもまた、この発明の方法に従って、変形してTNF活性を保持しておりそしてインビボ及びインビトロにおいて増強された比活性を有するであろう切り取られた形を得ることができる。これらのミューテインはN-末端の1~10個のアミノ酸、C-末端におけるアミノ酸の配列、又

はこの両者を欠いている。これらのミューテインもまた特徴的にTNFの定義に属する。

最後に、天然源から精製されたTNFをモデルとして使用して遺伝子が造成された。3位及び4位の2個のセリン残基が除去されているミューテインをコードする遺伝子及び15位及び16位のhis-valカブレットがval-serにより置換されているミューテインをコードする遺伝子が調製された。

記号に関し、便宜上第1図中1~157と番号を付したアミノ酸配列を有する蛋白質を参照として使用し、そしておそらく勝手にmTNF(成熟TNF)と称されるであろう。mTNFとの相同性を有しそしてTNFの生物学的活性を示す他のすべてのアミノ酸配列はmTNFのミューテインと称され、そして図中に示される残基の番号を用いてmTNFからの差異に示されるであろう。例えば、69位のシステインの置換を有するミューテインは置換された残基及び位置の番号を用いて示され、例えば69位においてシステインの代りにセリンを有するペプチドはser₆₉TNFとして示されるであろう。残基が単に欠失している場合には、それはdes-残基として命名され、従って例えば、3位及び4位のセリンが除去されているミューテインはdes-ser_{3,4}TNFと称されるであろう。N-末端の除去は、▽及びそれに次ぐ欠失の数をを用いて対応する数のアミノ酸を欠くものとして示されるであろう。例えば、第1図に示した蛋白質に比較して1個のN-末端アミノ酸を欠くミューテインは▽1TNFとして命名されるであろう。C-末端の欠失については、▽の次に最後の

残っている残基の番号及びマイナス記号が付されるであろう。従って、C-末端から7個のアミノ酸が除去されているミューテインについては名称は▽150-TNFであろう。上記の変化の組み合わせが行われる場合、名称はそのすべてを示し、例えば△des-ser_{3,4}des-ser₆₉▽150-TNFとなるであろう。

mTNFのミューテインのすべてが組換えにより又は意図的に製造されるわけではない。確かに、D.L.H.に後記するHL-60により分泌されるTNFの22個のN-末端アミノ酸について得られた配列を第1図に示される推定される配列の対応する部分と比較することにより、両蛋白質はTNF活性を示すにもかかわらず一次構造中にわずかな変化が存在することがわかる。具体的には、推定される配列は、HL-60由来の蛋白質の4~12位と推定される配列の5~14位の間に示される相同性を回復する前に3位のセリンの次に追加の一対のセリン残基を有する。さらに、HL-60由来蛋白質の13位及び14位はvar-serであり、推定される配列の対応する15位及び16位はhis-varである。

“作用可能に連結された”とは、複数の構成成分がそれらの通常の機能を行うように配置されている並置を意味する。従って、コード配列に作用可能に連結されている制御配列は該コード配列の発現を行うことができる。

“制御配列”は、1又は複数のDNA配列であって、目的のコード配列に作用可能に連結された場合に、該DNA配列と適合性の宿主中で該コード配列の発現を行うことができる

ものを意味する。このような制御配列は原核生物及び真核生物宿主の両者におけるプロモーター、及び原核生物においてはさらにリボゾーム結合部位配列、そして真核生物においてはターミネーションシグナルを含む。発現を行うために必要であるか又は好ましい追加のファクターも後で特定されよう。この明細書において使用する場合、“制御配列”は単に、使用される特定の宿主において発現を行うために必要とされるすべてのDNA配列に関する。

“細胞”、“組換え宿主”、又は“宿主細胞”はしばしば交換可能に使用され、そして文脈から明らかになるであろう。これらの用語は直接の対象細胞、及び言うまでもなくそれらの子孫を包含する。環境中での偶然変異及び変化のため、すべての子孫が親細胞と正確に同一というわけではないことが理解される。しかしながら、上記の用語が使用される場合、このような変化した子孫も含まれる。

B. 一般的記号

ヒトTNFをコードするDNA配列を得るために下に示される方法は例示的であり且つ典型的なものである。他の方法を使用することでもできる。完全なDNA配列がイントロンを含まない形で得られたので、そしてこの明細書中に開示するので、言うまでもなく目的とするDNA配列を得るために同じ方法を反復する必要はない。のみならず、発現のためにこの明細書に例示するのと同じ系を使用する必要もない。C項においてさらに詳細に示すように、目的とするTNFの生産を行うために使用され得るであろう種々の宿主及び制御配列

が当業界において入手可能である。

例示される方法において、B.1. 項に記載するようにTNFを分泌するように、ヒト前骨髄球性白血病セルラインHL-60が改良された誘導法によって誘導された。この蛋白質は、B.2. 項において記載するように新規な精製法を用いて均一に精製され、そして生ずる精製された蛋白質がアミノ酸配列決定にかけられた。これがプローブ混合物の造成を可能にし、このプローブが次に、B.3. 項に記載するように適切なコード配列を得るために使用された。このコード配列は、適当な原核性制御系を含有しそして哺乳類細胞での発現のためにウィルスプロモーターを用いるベクター中に連結することにより、この例示における発現のために使用された。

cDNA配列の検索からすでに得られているDNA配列のミューテインを生じさせるためコード配列中の変形を行った。このような変形はプライマー指令変異誘導により行われ、そして増強された活性を示す短縮された形のTNFが提供された。

B.1. 改良された誘導法

誘導にけるセルラインHL-60ヒト前骨髄球性白血病セルラインはそれ自体比較的未分化である。分化することが許容されれば、このものは一層特異的に規定された細胞タイプのコロニーを形成する。その後の事象に依存して、このものは顆粒球に、又は単球に成熟し、この単球は次にさらに分化してマクロファージになることができる。マクロファージ画分がTNFのインビボ生産を担うと予想される。他方、

TNFを含有する上清の場合によっては例えば市販の濃縮用フィルター、例えばアミコン中空繊維又はミリポアベリコン限外濾過ユニットで処理することにより濃縮する。次に、濃縮物を適当な陰イオン交換樹脂、例えばDEAEアガロース、DEAEセルロース、又はQAEアガロース、好ましくはDEAEアガロースで処理する。処理条件、すなわちpHが約7~9で合計塩濃度が約0.01~0.07Mの溶液は、TNF活性が支持体に吸着しないようなものである。

次に、非結合画分を、例えば任意の市販のサイズ分画用ゲル、例えば約70,000ダルトンの分子置排除を有するセファデックスG-75スーパーファイン（ファルマシア）を用いるゲル濾過によりさらに精製する。ゲルで処理した後のTNF含有画分を次に適当な条件下でSDS-PAGEにかけ、そしてTNF活性を含有するゲルスライスを回収する。SDS-PAGEはLaemmli等、Nature(1970) 227:680の方法に従って行われそしてこれは当業界においてよく知られている技法である。適切な範囲内での特定の条件の変更は可能でありそしてよく理解される。

次に、SDS-PAGEからの活性含有画分を逆相HPLCにかけ、そして0.1% TFA中0~80%アセトニトリルグラジエントにより溶出する。使用することができる他のグラジエント溶出系は酢酸及びn-プロパノールを含む。

こうして得られるヒトTNFはN-末端アミノ酸の配列決定を可能にするのに十分に純粋である。

見かけ上密接に関連しているリンホトキシンはBリンパ球により生産されることが考えられる。

対象細胞により生産されるTNFのレベルは誘導法の改良により10~20倍増加し得ることが見出された。Gifford, G等により考案された既知の方法（私信）は20%血清中37℃、30分間、10 μ g/mlでのホルボル（phorbol）エステル12-O-テトラデカノイルホルボル-13-O-アセート（TPA）による処理を用いる。次に、細胞培養物が回転沈降され、そしてインシュリン及びトランスフェリン（各10 μ g/ml）が補充された無血清培地中10 μ g/mlのエンドトキシンにより処理される。最初のインキュベーションにおいて無血清培地を用いてホルボルエステルの濃度を100 μ g/mlに低下せしめることにより、そしてエンドトキシン処理の段階において10 μ MカルシウムイオノホーレA23817を添加することにより、エンドトキシンと共にインキュベートした後の上清中のTNFの含量が実質的に増加する。

B.2. TNFの精製

さらに、誘導された細胞培養物からTNFを精製するための改良された方法が開示される。この方法はTNFを含有する上清を、TNFの吸着を許容しない条件下で陰イオン交換樹脂により処理し、次にTNF含有画分をサイズ分画用ゲルで処理して活性画分を得、次にこれをSDS-PAGEにかけ、そしてこれをSDS-PAGEからのTNF含有画分をHPLCによりさらに精製する。

第1段階において、陰イオン交換樹脂に適用する前に、

B.3. コード配列の単離

HL-60細胞から調製されたmRNAは、標準的な卵母細胞翻訳系に加えられた場合、L-929細胞毒性アッセイにおいて活性なTNF因子の生産を行うことができる。オリゴマープローブの相対効率を、このmRNA調製物と前インキュベートした場合にこの翻訳系におけるTNFの生産に負の影響を与えるそれらの能力により試験することができた（“ハイブリッド捕捉”）。卵母細胞系での画分の翻訳により所望のTNFコードmRNAがすでに同定されている場合、キナーゼ処理されたプローブへハイブリダイズするmRNAグラジエントのラジオオートグラフィーにより、前記の基準を一層精密なものにすることができる。蛋白質中の配列Asp-Lys-Pro-Val-Alaをコードする4個のプール（それぞれがmRNAに相補的であるように設計された16個の14マーを含む）のいずれが正しい配列を含有しているかを決定することが可能であった。16個のオリゴマーのこの混合物がTNFコードmRNAのみにハイブリダイズするために十分に特異的ではないことをNorthernブロットにより示すことができたので、これらの“ハイブリッド捕捉”実験を8対の14マーを用いて反復した。1対がmRNAを特異的にハイブリダイズするのに好結果をもたらした。

一旦十分に特異的なプローブが同定した後、目的のTNFをコードするmRNA画分から形成されたcDNAライブラリーを検索するためにこれを使用した。28個の好結果のハイブリダイズするコロニーを拾い、プラスミドDNAを単離し、

そして幾つかの挿入部を配列決定した。完全なコード配列を含有するプラスミド調製物をpE4と命名し、そしてコード配列源として使用した。追加のプラスミド調製物pB11を哺乳動物発現のために使用した。

B.4. TNFの発現

pE4の挿入部のスクレオチド配列決定は、言うまでもなく、コード配列の位置及び挿入部中の利用可能な制限部位の分析を可能にした。相溶性は完全ではなかったが、正しい置き換えを容易に行うことができた。操作を容易にするため、成熟蛋白質のN-末端アミノ酸のためのコドンと位相を合わせて且つそのすぐ前にATG開始コドンを書き、そしてこのATGのすぐ上流にHind III部位を含有せしめるのが望ましかった。これは部位特定変異誘発により達成された。その詳細は後で記載する。次に、この適切な開始シグナルを有するコード配列を2つの部分、すなわちHind III / Pst I断片及びPst I / Bam HI断片に切り取り、そしてこれらの断片を制御配列を含有する宿主発現ベクターに挿入することが可能であった。他の方法として、完全な配列をHind III断片として切り取ることができた。使用される特定の宿主発現ベクターは、Hind III部位の上流のtrpプロモーター及び下流Bam HI部位を含有するpTRP3、並びに同様に配置されたP_Lプロモーターを含有するpPC54.1及びpPLOPである。

これらの発現ベクターを適当なE. coli (E. coli) 宿主に形質転換し、そして得られた形質転換体をTNFの生産をもたらす条件下で培養した。音波処理し、そして次に音波処理

物をチャオトロピック剤(chaotropic agent)で処理して目的のTNFを可溶化することによりTNFを細胞から回収することができ、又は超音波処理物を直接アッセイすることができる。

最初の発現はE. coli中で達成された。しかしながら、C.1項において非常に詳細に記載のごとく、pE4又はpB11からのコード配列を、他の原核生物、酵母、組織培養物、又は植物細胞中での発現に適する制御配列に連結することもできた。哺乳動物細胞中での発現は実際にpB11のSV40プロモーターを用いて達成された。適切な宿主の選択は、分泌を行う可能性、翻訳後プロセッシングを行う可能性、及び適切な増殖条件下で目的の蛋白質を高レベルで生産する能力を含む多くの因子に依存するであろう。

B.5. アッセイ

B.5.a 細胞毒性アッセイ法

L-929 アッセイ系は、TNF活性の迅速な測定を可能にする改良された便利なインビトロアッセイ法である。Carswellのインビトロ腫瘍壊死アッセイとの相関の程度は現在のところ知られていない。しかしながら、これは特にネズミ腫瘍細胞を使用するので、相関性は高いと予想される。EPO公開№0100641(前掲)においてリンホトキシンと称される蛋白質もこのアッセイにおいて活性を与える。このアッセイ法は概念において、ネズミL-M細胞及びメチレンブルー染色を使用する米国特許№4,457,916に開示されているものに類似する。L-929 アッセイ法はヒト腫瘍セルライン細胞毒性と相

関する(HL-60由来TNFについて)ことが示された(D.1.b項を参照のこと)。

この発明のL-929 アッセイ系において、L-929細胞はマイクロタイタープレート中で単層として一夜調製される。試験サンプルをプレートにわたって2倍希釈し、UV照射し、そして次に調製された細胞単層上加える。次に、ウェル中の増地を1µg/mlアクチノマイシンDにする。プレートを37℃にて18時間インキュベートし、そしてプレートを顕微鏡下で視覚的にスコアする。ウェル中の細胞死の程度を示す25%、50%、75%及び100%の標示を各ウェルに与える。TNF活性の1ユニットを50%の死滅を生じさせる希釈の逆数として定義する。

さらに、このアッセイ法の一層高感度の変法が開発された。この方法は、試験サンプル及びアクチノマイシンDにより処理された場合に、前ラベルされた細胞からの³⁵Sでラベルされたペプチドの放出をモニターする。アッセイ法のこの変法は力価を定量するため、例えば卵母細胞により翻訳された物質の相対力価を評価するために使用することができる。要約すれば、活発に増殖しているL-929の培養物を、2%の透析されたウシ胎児血清が補充されたメチオニン不含有増地中で³⁵S-メチオニン(200µCi/ml)により3時間ラベルする。次に細胞を洗浄し、そして96ウェルプレート中にプレートし、そして一夜インキュベートし、そして次の日に試験サンプルの2倍希釈物及び1µg/mlのアクチノマイシンDで処理する。次に、培養物を37℃にて18時間インキュ

ベートする。次に、各ウェルからの100µlの上清アリコート他96ウェルプレートに移し、酸(TCA)沈澱せしめ、そしてガラス繊維フィルター上に回収する。フィルターを95%エタノールで洗浄し、乾燥し、そして計数する。すべてのアッセイにN.P.o.洗剤対照を含めて細胞からの放射能の最大放出を測定する。次に、³⁵S放出(%)を処理細胞と未処理対照との間のカウントの差をN.P.o.処理細胞と未処理細胞との間のカウントの差で除した比率、すなわち、

$$\text{放出(\%)} = \frac{\text{サンプル-細胞対照}}{\text{N.P.o.-細胞対照}} \times 100$$

で表わされる比率により計算する。TNFの力価が高くなるに従ってこの比率が高い値となる。上記のアッセイ法は、対象細胞としてヒト腫瘍セルラインを使用するために便利に変更される。上記のL-929細胞の場合と同様にしてユニットを定義し、そして放出(%)を計算する。

B.5.b インビボアッセイ

調製物はまた、腫瘍を殺し又はその成長を抑制し、そして該腫瘍を担持する動物を死亡から保護するその物質の能力を用いて、TNF活性について試験することができる。Balb/cマウスに種々のタイプの腫瘍細胞を皮下注射することにより局在化した腫瘍を形成せしめた。腫瘍セルラインは腹水からの細胞懸濁物として得られるMethAマウス線維肉腫、及び1aa²の細胞塊として投与されるMCF-7ヒト乳癌を包含した。

アッセイのため、雌性Balb/cマウス(19-22g)に26

ゲージ針により0.1 mlの媒体中に 5×10^5 個の繊維肉腫細胞を含有する懸濁液又はMCF-7塊を皮下注射した(繊維肉腫懸濁液は8日目の腹水から細胞の計数及び血清不含有培地による稀釈により調整した)。9~10日後、腫瘍が触知可能になった時、試験すべきTNFの量(マウス当り1 μ gの範囲)を注射し、そしてその後の日に所望によりTNF投与を反復した。腫瘍の体積を測定することにより、及び生存率により結果を評価した。

B.6. TNFミューテインの生産

この発明は、最適活性の蛋白質を得るために有利なmTNFの多数の変形を意図する。前記B.5.a項の細胞毒性アッセイにおいて匹敵する又は増加した比活性をもたらす一次アミノ酸配列の幾つかの特定の変化を得た。mTNFの配列からの最初の10個又はそれより少い数のアミノ酸の除去の幾つかは、“天然”組換え蛋白質の比活性と同等か又は数倍高い比活性を有する蛋白質をもたらす。mTNFのシステイン除去ミューテインもまた、これらのミューテインのN-末端除去形がそうであると同様に、TNF活性を示す。

これらのミューテインの幾つかの製造は、TNFのためのコード配列を含有する発現ベクターを所望のコード配列に対応するプライマーを用いて部位特定変異誘発にけることにより行われる。こうして、コード配列中に適切な変化を有する変形された発現ベクターが得られる。得られた変形されたベクターを適当な宿主に形質転換し、次にこれをコードされたミューテインの生産をもたらす条件下で培養する。次に、

これらのミューテインは“天然蛋白質”と同様に細菌培養物から精製され、そして低下していないか又は増強されている活性を有することが示される。

特に、 $\nabla 4$ TNFミューテイン及び $\nabla 6-10$ TNFミューテインは2つの点においてmTNFに明らかに卓越している。すなわち、これらは一層高い比活性を有し、そしてこれらは“きれいな”生成物として生産される。後に一層詳細に示すように、これらの好ましい具体例の幾つかについて、精製された蛋白質の活性は細胞毒性アッセイにおいてmTNFにより示されるそれよりも数倍高い。さらに、等電点電気泳動ゲル上での挙動により証明されるように、精製された組換えmTNFは側鎖の変形を有するらしい一群の蛋白質を示すのに対して、これらのミューテインはこの方法にかけられた場合本質的に1個のバンドを与える。

C. 標準的方法

細胞を形質転換し、ベクターを造成し、メッセンジャーRNAを抽出し、cDNAライブラリーを調製する等のために使用される技法のほとんどは当業界において広く実施されており、そしてほとんどの実施者は特定の条件及び方法を記載する標準的手段に親しんでいる。しかしながら、便宜上次の項がガイドラインとして役立つであろう。

C.1. 宿主及び制御配列

原核生物はほとんどの場合E. コリの種々の株により代表される。しかしながら、他の微生物株、例えばバチルス、例えばバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)、シュード

モナス(*Pseudomonas*)の色々な種、又は他の細菌株を使用することもできる。このような原核生物系において、宿主と適合性の種に由来する複製開始点及び制御配列を含有するプラスミドベクターが使用される。例えば、E. コリは、Boliver等、*Gene* (1977) 2: 95によるE. コリ株由来のプラスミドであるpBR322の誘導体を用いて形質転換される。pBR322はアンピシリン及びテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含しそしてそれ故に所望のベクターの造成において維持されるか又は破壊されることが出来る追加のマーカーを提供する。この明細書において転写開始のためのプロモーター及び場合によってはオペレーターをリボゾーム結合配列と共に包含するものとして定義される一般に使用される原核性制御配列には、 α -ラクトマーゼ(ペニシリナーゼ)及びラクトース(lac)プロモーター系(Chang等、*Nature* (1977) 198: 1056)、及びトリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddel等、*Nucleic Acids Res.* (1980) 8: 4057)、並びにラムダ由来P_Lプロモーター及びN-遺伝子リボゾーム結合部位(Shimatake等、*Nature* (1981) 292: 128)(これは、1984年2月8日に出願され、そして同じ承継人に承継された係属中の出願No. 578,133中に記載されているようにポータブル制御カセットとして有用にされている)のごとき一般に使用されるプロモーターが含まれる。しかしながら、原核生物に適合性の任意の入手可能なプロモーター系を使用することができる。

細菌のほかに、真核性微生物、例えば酵母を宿主として使

用することもできる。パン酵母であるサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の実験室株が最も使用される。但し他の多くの菌株も一般に入手可能である。2ミクロン複製開始点を用いるベクターが例示される(Broach, J. R., *Meth. Eng.* (1983) 101: 307)が、酵母での発現のために適当な他のベクターが知られている(例えば、Stinchcomb等、*Nature* (1979) 282: 39; Tschape等、*Gene* (1980) 10: 157; 及びClarke, L.等、*Meth. Eng.* (1983) 101: 300を参照のこと)。酵母ベクターのための制御配列には解糖系酵素の合成のためのプロモーターが含まれる(Hess等、*J. Adv. Enzyme Reg.* (1968) 7: 149; Holland等、*Biochemistry* (1978) 17: 4900)。当業界において知られている他のプロモーターには3-ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター(Ritzman等、*J. Biol. Chem.* (1980) 255: 2073)、並びに他の解糖系酵素、例えばグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ビルベートキナーゼ、トリホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼのプロモーターが含まれる。増殖条件により転写が制御されるといふ追加の利点を有する他のプロモーターはアルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、並びにマルトース及びガラクトースの变化を担当する酵素(Holland, 前掲)である。さら

に、コード配列の3'末端においてターミネーター配列が望ましいと信じられる。このようなターミネーターは酵母由来配列中コード配列に続く3'非翻訳領域中に見出される。例示されるベクターの多くがエノラーゼ遺伝子含有プラスミド pona 4 6 [Holland, M. J. 等, *J. Biol. Chem.* (1981) 256: 1385] 又は YEp 13 から得られる LBU 2 遺伝子 [Broach, J. 等, *Gene* (1978) 8: 121] が含まれるが、酵母適合性プロモーター、複製開始点及び他の制御配列を含有する任意のベクターが適当である。

言うまでもなく、多細胞生物由来の真核宿主細胞培養物中でポリペプチドをコードする遺伝子を発現せしめることも可能である。例えば、*Tissue Cultures*, アカデミックプレス、Cruz 及び Patterson 編 (1973) を参照のこと。有用な宿主セルラインにはペロ細胞、ヒラ細胞、及びチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞が含まれる。このような細胞のための発現ベクターは一般に哺乳類細胞と適合性のプロモーター及び制御配列、例えばシミアンウイルス 40 (SV40) 由来の一般に使用される初期及び後期プロモーター [Piers 等, *Nature* (1978) 273: 113]、及び他のウイルスプロモーター、例えばポリオマ、アデノウイルス 2、ウシバビローマウイルス、又は鳥肉腫ウイルス由来のプロモーターが含まれる。哺乳類細胞宿主系形質転換の一般的観点は 1983 年 8 月 16 日に与えられた Axel 等の米国特許 № 4,399,216 に記載されている。今やさらに、発現を最適化するために“エンハンサー”領域が重要なようであり、これらは一般に非コード DNA 領

域中プロモーター領域の上流又は下流に見出される配列である。必要であれば、複製開始点はウイルス源から得ることができる。しかしながら、染色体への組込みが真核生物における DNA 複製の一般的機構である。植物細胞も今や宿主として使用することができ、そして植物細胞と適合性の制御配列、例えばノバリン・シンナーゼプロモーター及びポリアデニレシヨシグナル配列 [Depicker, A. 等, *J. Mol. Appl. Gen.* (1982) 1: 561] を使用することができる。

C.2. 形質転換

使用される宿主細胞に依存して、そのような細胞に適する標準的技法を用いて形質転換が行われる。Cohen, S.N., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1972) 69: 2110 により記載されるような塩化カルシウムを用いるカルシウム処理、又は Maniatis 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982) コールドスプリングハーバープレス、254 頁に記載されている RbCl₂ 法を原核細胞、又は実質的な細胞壁障壁を含有する他の細胞のために使用した。アグロバクテリウム・チュノファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) による感染 [Shaw, C.H. 等, *Gene* (1983) 23: 315] をある種の植物細胞のために使用する。このような細胞壁を有しない哺乳類細胞のためには、Graham 及び van der Eb, *Virology* (1978) 52: 546 のリン酸カルシウム沈澱法が好ましい。酵母への形質転換は Van Solingen, P. 等, *J. Bact.* (1977) 130: 946 及び Hsiao, C.L. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1979) 76: 3829 の方法に従って行う。

C.3. cDNA 及び遺伝子ライブラリーの検索

cDNA 又はゲノムライブラリーはコロニーハイブリダイゼーション法を用いてスクリーニングする。各マイクロタイプレートに 2 株のニトロセルロース濾紙 (S & S タイプ B A-85) 上にレプリカし、そしてコロニーを 37℃ にて 14~16 時間、50 µg/ml の Amp を含有する LB 基天上で増殖せしめる。コロニーを細胞溶解し、そして 500 mM NaOH、1.5 M NaCl にて 5 分間処理することにより DNA をフィルターに固定し、そして 5×標準食塩クエン酸塩 (SSC) により 2 回それぞれ 5 分間ずつ洗浄する。フィルターを空気乾燥し、そして 80℃ にて 2 時間加熱する。2 枚のフィルターを 42℃ にて 6~8 時間、フィルター当たり 10 ml の DNA ハイブリダイゼーション緩衝液 (5×SSC、pH 7.0、5×デンハート溶液 (ポリビニルピロリドン+フィコール及びウシ血清アルブミン; 1×=各 0.02%)、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0、0.2% SDS、20 µg/ml ポリ U、及び 50 µg/ml 変性サケ精子 DNA) とハイブリダイズせしめる。

サンプルを、所望の感しさに依存する条件下でキナーゼ処理されたプローブとハイブリダイズせしめる。典型的な中程度の感しさの条件は、プローブを含有する DNA ハイブリダイゼーション緩衝液 1~5 ml/フィルターと共に 24~36 時間 42℃ の温度を用いる。より高い感しさのためには高い温度及びより短い時間が用いられる。フィルターを、37℃ にて 30 分間ずつ 4 回、2×SSC、0.2% SDS 及び 50

mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) により洗浄し、次に 2×SSC 及び 0.2% SDS により 2 回洗浄し、空気乾燥し、そして -70℃ にて 2~3 日間オートラジオグラフ処理する。

C.4. ベクターの造成

所望のコード配列及び制御配列を含有する適当なベクターの造成は当業界においてよく理解されている標準的連結及び制限技法を用いる。単離されたプラスミド、DNA 配列、又は合成されたオリゴヌクレオチドは開裂され、仕立てられ、そして所望の形に再連結される。

部位特異的 DNA 開裂は、適当な制限酵素 (1 種又は複数種) で処理することにより、当業界で一般に理解されている条件下で行い、そして具体的な条件はそれらの市販制限酵素の製造者により特定されている。例えば、ニューイングランドバイオラボの製品カタログを参照のこと。一般に約 1 µg のプラスミド又は DNA 配列を 1 ユニットの酵素により約 20 µl の緩衝液中で行う。この発明の例においては、典型的には過剰の制限酵素を用いて DNA 基質の完全な消化を保証する。37℃ にて約 1~2 時間のインキュベーション時間が実施可能であるが、これと異なることもできる。各インキュベーションの後、フェノール/クロロホルムを用いる抽出により蛋白質を除去し、そして次にエーテル抽出することでもでき、そしてエタノールにより沈澱せしめることにより水性成分から核酸を回収し、次にセファデックス G-50 スピニングラムに通す。所望により、開裂された断片のサイズ分類を標準的技法を用いるポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲ

ル電気泳動により行うことができる。サイズ分離の一般的技法は Methods in Enzymology (1980) 65: 499-560 に見出される。

制限酵素開裂された断片は、E. コリ DNA ポリメラーゼの大断片 (Klenow) を用いて、4 種類のデオキシヌクレオチドトリホスフェート (dNTP) の存在下で 20~25℃ にて約 15~25 分間のインキュベーション時間を用いて、50 mM Tris (pH 7.6)、50 mM NaCl、6 mM MgCl₂、6 mM DTT 及び 5~10 μ M dNTP 中で処理することより平滑末端化することができる。Klenow 断片は 5' 接着末端をフィリインするが、4 種類の dNTP が存在していても突出 3' 単鎖をチューバックする。所望により、接着末端の性質により指定される制限内で唯一の又は選択された dNTP を供給することにより選択的修復を行うことができる。Klenow で処理した後、混合物をフェノール/クロロホルムで抽出し、そしてエタノール沈澱を行い、次にセファデックス G-50 スピニングラムに通す。適当な条件下での S1 スクレアゼによる処理が単鎖部分の加水分解をもたらす。

合成オリゴヌクレオチドは、Matteucci 等、J. Am. Chem. Soc. (1981) 103: 3185 のトリエステル法により、又は市販の自動オリゴヌクレオチド合成機を用いて調製する。アニーリングに先立つ、又はラベル化のための単鎖のキナーゼ処理は、50 mM Tris (pH 7.6)、10 mM MgCl₂、5 mM ジチオスレート、1~2 mM ATP、1.7 μ ole³ P-ATP (2.9 mCi/ μ ole)、0.1 mM スペルミジン、0.1 mM

EDTA の存在下で、過剰の、例えば 0.1 nmole の基質に対して約 10 ユニットのポリヌクレオチドキナーゼを用いて達成される。

連結は 15~30 μ l の容積中で次の標準的条件及び温度で行う：20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、33 μ g/ml BSA、10 mM~50 mM NaCl；及び“接着末端”連結のためには 40 μ M ATP、0.01~0.02 (Weiss) ユニットの T. DNA リガーゼ、0℃、又は“平滑末端連結のためには 1 mM ATP、0.3~0.6 (Weiss) ユニットの T. DNA リガーゼ、14℃。分子間“接着末端”連結は通常、33~100 μ g/ml の全 DNA 濃度 (5~100 nM 全末端濃度) で行う。分子間平滑末端連結 (通常、10~30 倍モル過剰のリンカーを用いる) は 1 μ M 全末端濃度で行う。

“ベクター断片”を用いるベクターの造成において、ベクター断片は一般に細菌アルカリホスファターゼ (BAP) で処理して 5' のリン酸を除去し、そしてベクターの再連結を防止する。BAP 消化は、pH 8 にて約 150 mM Tris 中で、Na⁺ 及び Mg⁺⁺ の存在下 1 μ g のベクター当り約 1 ユニットの BAP を用いて 60℃ にて約 1 時間行う。核酸断片を回収するため、調製物をフェノール/クロロホルムで抽出しそしてエタノール沈澱を行い、そしてセファデックス G-50 スピニングラムに適用して脱塩する。別の方法として、不期望の断片の追加の制限酵素消化により 2 重消化されたベクターにおいて再連結を回避することができる。

配列の変更を必要とする cDNA 又はゲノム DNA 由来のベクターの部分のために、部位特定プライマー-指令変異誘発を用いる。これは、目的の変異を代表する限定されたミスマッチを除くほか変異すべき単鎖ファージ DNA に相補的なプライマー-合成オリゴヌクレオチドを用いて行う。要約すれば、ファージに相補的な鎖の合成を指令するためのプライマーとして合成オリゴヌクレオチドを用い、そして得られた 2 本鎖 DNA をファージを支持する宿主細菌中に形質転換する。形質転換された細菌の培養物を上層寒天中にプレートし、ファージを担持する単一細胞からのブラックを形成せしめる。

理論的には、新しいブラックの 50% は単一鎖として変異した形を有するファージを含有し、50% はもとの配列を有するであろう。得られたブラックを、正確にマッチするハイブリダイゼーションを許容するがしかしもとの鎖とのミスマッチがハイブリダイゼーションを回避するのに十分であるような温度において、キナーゼ処理された合成プライマーとハイブリダイズせしめる。次に、プローブとハイブリダイズするブラックを拾い、培養し、そして DNA を回収する。部位特定変異法の詳細は具体的な例において後記する。

C.5. 造成物の確認

下記の造成物において、プラスミド造成物の正しい連結の確認においてはまず、E. コリゼネティック・ストック・センターから得られる E. コリ MN294 株 (CGSC #6135) を連結混合物により形質転換する。好結果の形質転換体を、アンピシリン、テトラサイクリンもしくは他の抗生物質耐性により、

又はプラスミド造成の態様に依存して他のマーカーを用いて選択する。次に、形質転換体からのプラスミドを、場合によってはクロラムフェニコール増幅 [Clewett, D.B., J. Bacteriol. (1972) 110:667] の後、Clewett, D.B. 等、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1969) 62: 1159 の方法に従って調製する。単離された DNA を制限酵素処理により分析し、そして/又は Messing 等、Nucleic Acids Res. (1981) 9: 309 によりさらに記載された Sanger, F. 等、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1977) 74: 5463 のジデオキシ法により、又は Maxam 等、Methods in Enzymology (1980) 65: 499 の方法により配列決定する。

C.6. 例示される宿主

この発明においてクローニング及び発現のために使用される宿主菌株は次の通りである。

クローニング及び配列決定、並びにほとんどの細菌プロモーターの制御のもとでの造成物の発現のため、E. コリ MN294 株 (前掲)、Talanage, K. 等、Gene (1980) 12: 235; Messelison, M. 等、Nature (1968) 217: 1110 を宿主として使用した。P. N... プロモーターの制御のもとでの発現のため、E. コリ K12 MC1000 ラムダ溶原株 λ N₁ c1857 S₊ P₊、ATCC 39531 (以後、MC1000-39531 と称する場合がある) を使用する。

M13 ファージ組換え体のため、ファージ感染に感受性の E. コリ株、例えば E. コリ K12 株 DCG98 を使用する。DCG98 株は 1984 年 7 月 13 日に ATCC に寄託され、そして受託番号 1965 を有する。

D. ヒトTNFのクローニング及び発現

次に、ヒト-TNF-1のためのコード配列を取得し、この配列の発現ベクターへの配置し、そして目的の蛋白質の発現を得るための方法を例示する。

D.1. ヒトTNFの調製及び精製

D.1.a. TNFの誘導

高濃度(約 2×10^6 細胞/ml)の定常期のHL-60細胞を遠心分離し、血清の非存在下でRPMI1640培地で洗浄し、そして次に 1×10^7 細胞/mlの濃度に再懸濁した。次に、細胞を一定攪拌を伴って37℃にて30分間、懸濁培養において、100 ng/mlのホルボールエステル、12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート(TPA)で処理した。培養物を遠心し、上清をデカントし、細胞を10 µg/mlの細菌リポポリサッカライド(LPS)及び10 µMのCaイオノホーレ(A23817)を含有するRPMI中に 1×10^7 細胞/mlで一定攪拌のもとで37℃にて4時間再懸濁した。細胞を1200rpmにて10分間回転沈降せしめ、そして上清を8000rpmにて20分間再遠心分離した。得られた上清をD.1.b項の精製法において用いて天然TNFを得た。

D.1.b. TNFの精製

D.1.a. 項において誘導されたHL-60から調製された約4~8 µlの上清をアミコン中空纖維(1平方フィートのカートリッジ/10,000 MWカットオフ)により約300 mlに濃縮した。濃縮された培養液を遠心して細胞破片を除去し、そして上清を30 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH 8.2)

HPLCカラム上に適用し、そして0.1% TFA中0%~60%アセトリルの直線グラジエントを用いて活性を溶出した。蛋白質を280 nm及び214 nmにおいてモニターし、そして画分を凍結乾燥後にバイオアッセイし、そして30 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH 7.4)中に懸濁した。TNF活性を含有する画分を再度凍結乾燥した。

得られた蛋白質は配列決定分析のために使用するのに十分な純度を使っていた。ガス相シーケンサー(アプライド・バイオシステムズ社)を用いて配列を決定した。最初の22個のアミノ酸から得られた配列を次に示す。

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Val	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys
10	11	12	13	14	15	16	17	18
Pro	Val	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Asn	Pro
19	20	21	22					
(Gln)	(Ala)	Glu	Gly					

さらに、精製された蛋白質(G-75ゲルから)を他のヒト腫瘍及び正常セルラインを基材(substrate)として用いるL-929細胞毒性アッセイの変法を用いて試験した。L-929細胞に対するこのアッセイにおいて毒性であったG-75画分は、H_{939T}(黒色腫系)、BT-20(乳癌)、A427(肺癌)、HT-1080(結腸癌)、及びHT-29(結腸癌)に対しても毒性であった。これらの画分はH₉₃₉sk(皮膚線維芽細胞)、ヒール細胞(頸癌)、H_{27P}(包皮線維芽細胞)、又はCOS7(SV-40で形質転換されたサル細胞)に対して

により6.2 mSの電導度に調整した。この溶液をPM10(アミコン)膜を用いる限外濾過によりさらに濃縮し、そして濃縮された液を遠心分離(20,000×g、10分間)により透明にした。

次に、上清を、30 mM炭酸水素アンモニウム/1 mM NaCl(pH 8.2)中で平衡化したDEAEイオン交換カラムに適用し、そしてカラムを同じ緩衝液で洗浄した。画分を集め、そして蛋白質を280 nmでモニターした。これらの非結合画分をL-929細胞毒性アッセイを用いてアッセイし、そしてTNF活性を有する画分をブールし、そして限外濾過により再度濃縮した。

この濃縮物を、30 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH 7.4)中で平衡化したセファデックスG75スーパーファイン(ファルマシア)に適用した。同じ緩衝液により洗浄することによって得られた非結合画分を280 nmにおいてモニターし、そしてTNFについてアッセイした。ピークTNF生物活性を含有する画分を凍結乾燥した。

凍結乾燥された蛋白質をLaemmli SDSサンプル緩衝液中に再懸濁し、そしてSDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。ゲルを2 mmの切片に細断し、そして各切片からの蛋白質を1 mlの30 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH 7.4)中への浸漬しそして室温にて一夜凍とろうることにより溶出した。

TNF生物活性を有する切片を、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中で平衡化されたバイダック(Vydac)C-4逆相

毒性でなかった。

D.2. コード配列の調製

ヒトTNFをコードするイントロン不含有DNA配列をこの明細書に記載する方法により調製した。誘導された場合に大量のTNFを生産するヒト前骨髄球性白血病セルラインHL-60系(NoCCL240としてATCCから入手)を、cDNAライブラリーを得るためのmRNA源として使用した。これらの細胞から精製されたTNFから決定された蛋白質配列に基づいて造成されたオリゴヌクレオチドプローブを用いてこのcDNAライブラリーを検索し、蛋白質の完全コード配列を回収した。

D.2.a. 濃縮されたmRNAの調製

次の様にしてHL-60細胞から全メッセンジャーRNAを抽出しそして精製した。HL-60細胞をTNF生産のためにD.1.a.に記載したようにして誘導し、そして4時間の細胞懸濁液を遠心分離により取得した。全細胞質性リボ核酸(RNA)を次のようにして単離した。すべての段階は4℃で行う。細胞をPSB(リン酸緩衝化塩溶液)で2回洗浄し、そして10 mMバナジルアデノシン錯体(Berger, S.L.等、Biochem. (1979) 18: 5143)を含有するIHB(140 mM NaCl、10 mM Tris、1.5 mM MgCl₂、pH 8)に懸濁する。

エチレンオキシドポリマータイプの非イオン性洗剤を0.3%になるように加えて核膜ではなく細胞膜を溶解した。1,000×gにて10分間遠心分離することにより核を除去した。核

後の上清をTE (10 mM Tris、1 mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、pH 7.5) で飽和したフェノール/クロロホルム (1:1) (0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 及び10 mM EDTA を含有する) 等容量に加えた。上清を4回再抽出しそして2000×gにて10分間遠心して相分離した。サンプルを0.25 M NaClに調整し、2容量の100%エタノールを添加し、そして-20℃に貯蔵することによりRNAを沈澱せしめた。RNAを5,000×gにて30分間ベレット化し、70%及び100%のエタノールで洗浄し、そして乾燥した。ポリアデニル化 (ポリA⁺) メッセンジャー-RNA (mRNA) を全細胞質RNAからオリゴdTセルロース上でのクロマトグラフィーにより得た (Aviv, J. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1972) **69**: 1408-1412)。すなわち、RNAをETS (10 mM Tris、1 mM EDTA、0.5% SDS、pH 7.5) に2 mg/mlの濃度で溶解した。この溶液を65℃にて5分間加熱し、次に迅速に4℃に冷却した。RNA溶液を室温にした後、これを0.1 M NaClに調整し、そして結合緩衝液 (500 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 7.5) によりあらかじめ平衡化したdTセルロースカラムに通した。流過液をさらに2回カラムに通し、そしてカラムを10容量の結合緩衝液で洗浄した。ポリA⁺ mRNAをETSのアリコートにより溶出し、TEを飽和したフェノール/クロロホルムにより1度抽出し、そして0.2 MへのNaCl及び2容量の100%エタノールの添加により沈澱せしめた。RNAを2回再沈澱せしめ、70%エタノール中で1回、そし

ポリdGによる2本鎖cDNAのテイル形成、及び所望の制限部位において開裂されておりそしてポリdCによりテイル形成されているpBR322又はその誘導体のごとき適当なベクターへのアニーリングを用いる。この代替可能な方法の詳細な記載は例えば本承継人と同じ承継人に承継された米国特許出願No. 564,224中に見られる (これを引用によりこの明細書に組み入れる)。

この発明において使用される方法においては、濃縮されたmRNA (5 µg) を、22℃にて5分間10 mMメチル水銀で処理することによって変性し、そして100 mM 2-メルカプトエタノールを添加することにより解毒した (Payvar, F. 等, *J. Biol. Chem.* (1979) **254**: 7636-7642)。プラスミドpcDV1をKp m Iで開裂せしめ、dTTPでテイル形成し、そして変性したmRNAにアニーリングした。このオリゴdTプライムドmRNAを逆転写酵素で処理し、そして新しく合成されたDNA鎖にdCTPによりテイル形成した。最後に、pcDV1ベクターの所望の部分にHind IIIによる開裂によって除去した。これとは別に、pL1をPst Iにより開裂せしめ、dCTPによりテイル形成し、Hind IIIにより開裂せしめ、そして次にpcDV1ベクター断片により延長されたポリdTテイル形成されたmRNA/cDNAコンプレックスに、E. コリ・リガーゼを用いて連結し、そしてこの混合物をDNAポリメラーゼI (Klenow)、E. コリ・リガーゼ、及びRNアーゼHで処理した。生じたベクターをE. コリX12 MM294に形質転換してAmp^rとした。

て次に100%エタノール中で洗浄した後に乾燥した。

ポリA⁺ mRNAを、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA、10 mM NaCl及び0.1% SDS中でのシュエクロソグラジエントにより分離した。ベックマンSW40ローター中38,000rpmにて17時間遠心した後、mRNAをグラジエントからエタノール沈澱により回収した。mRNAを卵母細胞に注入しそして卵母細胞抽出物を細胞毒性活性についてアッセイすることによりTNF mRNAを含有する画分を同定した。ピーク活性を含有する画分をプールしてcDNAライブラリーの造成のために使用した。

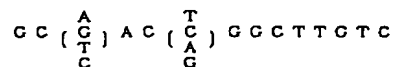
D.2.b. cDNAライブラリーの造成

ポリA⁺ テイルのオリゴdTプライミング及びAMU逆転写酵素を用い、Okayama, H. 等, *Mol. Cell Biol.* (1983) **3**: 280 (引用によりこの明細書に組み入れる) を用いて濃縮された16 SmRNA画分からcDNAを調製した。この方法は高い比率の十分に長いコドンをもたらし、そして宿主ベクターとしてそこに記載されておりそして著者から容易に入手することができる2つのベクター、すなわちpcDV1及びpL1の部分を使用する。得られたベクターは近位BamHI及びXhoI制限部位を含むベクター断片間に挿入部を含有する。このベクターはpBR322の複製開始点及びAmp^r 耐性遺伝子を含有する。

cDNAライブラリーを調製するための他の方法は、言うまでもなく当業界において良く知られている。今や古典的となった1つの方法は、オリゴdTプライマー、逆転写酵素、

D.2.c. プローブの選択

精製されたTNF配列のアミノ酸8-12のコード配列に相補的なオリゴマーを調製した。コドンの冗長性のため、合計64種類の14-マーをこの部分をコードするメッセンジャーに対する相補性の候補とする。合計64種類の14-マーを調製し、そして16種類ずつの4個のプールに分けた。各プールを、上記のようにして調製したシュエクロソグラジエント画分した濃縮されたmRNA調製物と混合し、そしてこの混合物を卵母細胞翻訳系に注入した。未処理のメッセンジャー-RNAを用いて対照試行を行った。卵母細胞系で生産された蛋白質をL-929細胞毒性アッセイ (³S放出) にかけて、対照及びmRNAと3つのオリゴマープールの混合物を注射された卵母細胞由来の蛋白質が活性を示した。この“ハイブリッド捕捉”アッセイにおいて、次の配列:



を有するプールで処理されたメッセンジャーを注入された卵母細胞のみ不活性であった。このオリゴマープールの特異性を、誘導されたHL-60細胞及び未誘導HL-60細胞の両者から上記のようにして調製した濃縮したmRNA、並びにリンホトキシンを生産することが知られている細胞から得られた対応するmRNA画分との“ドット・プロット”ハイブリダイゼーションを用いてさらに決定した。このプールは誘導されたmRNAには良好にハイブリダイズしたが、しかし

未誘導細胞又はリンホトキシン生産細胞からの対応する画分とはハイブリダイズしなかった。しかしながら、プローブとしてキナーゼ処理されたプールを用いるNorthernブロットは、これが18S (リボソーム) RNA画分及びpBR322 DNAと交差ハイブリダイズする配列を含有することを示した。

従って、この好結果のプールを、8対の14-マーとしてその構成員を合成し、その各対を用いて上記のようにして「ハイブリド捕捉」アッセイを行いことによりさらに分画した。次の配列:

GC (C/T) ACACGGCTTGTC

を有する対のみが、酵母細胞中でのTNFの合成の阻害において好結果であった。分画された誘導されたHL-60 mRNA画分、誘導された全HL-60ポリA⁺ RNA、未誘導HL-60ポリA⁺ RNA、及びpBR322 DNAを用いるドット・プロット実験は、目的のメッセンジャーにハイブリダイズするために前記の14-マー対が特異的であること、及び他の対が不能であることを確認した。

D.2.d. コード配列の回収

上に調製したcDNAをD.2.c.において同定した14-マー対を用いて検索した。プローブとハイブリダイズする28個のコロニーを拾い、培養し、そしてプラスミドDNAを単離した。全配列をコードするのに十分な長さの挿入部を含有するプラスミドを選択し、そしてB.5項において前記したようにして、細胞毒性アッセイの³²S放出形式と組合わせ

たハイブリド翻訳を用いて正しい配列について幾つかのプラスミドをアッセイした。ハイブリド翻訳アッセイは、試験配列が未分画調製物から正しいmRNAを回収することを利用し、これは回収されたメッセンジャーを注入した酵母細胞翻訳系により生産された蛋白質をアッセイすることにより確認される。

試験すべきプラスミドcDNAをフィルターに結合せしめ、そして誘導されたHL-60細胞から単離されたポリA⁺ RNAにより前記フィルターを処理する。次に、フィルターを溶出し、溶出物を酵母細胞翻訳系に注入する。酵母細胞を蛋白質について抽出し、次にこれをL-929 毒性アッセイの³²S形式において試験する。E2~E4、E6、及びE8と称する若干のハイブリダイズするクローンについての結果を下に示す。

サンプル	³² Sの放出 (%)
E 1	7
E 2	23
E 3	32
E 4	33
E 6	26
E 8	11
pBR322	9
A.	34
B.	24

(A. 及び B. はシュークロースグラジエントにより得られた濃縮されたmRNAを用いる対照であり、E1及びpBR322は陰性対照である。)

挿入部の制限分析及び部分配列決定は、2つの候補プラスミドpE4及びpB11が完全なTNFコード配列を有するらしいことを示した。pE4についてのこの分析の結果を第2図に示す。

pE4を配列決定し、そして3つの可能なリーディングフレームすべての翻訳から推定されるアミノ酸配列を、精製された蛋白質のN-末端配列決定により決定された天然成熟TNFの既知のN-末端配列とマッチさせることにより、TNFのための正しいリーディングフレームを同定した(第1図を参照のこと)。成熟蛋白質中のアミノ酸配列には、1位のバリンから出発して番号を付す。前記のごとく、相溶性は完全ではなかった。しかしながら、高度の相溶性により正しいcDNAが選択されていたことが示された。第2図に示す実験的に決定された制限開裂部位の証明も与えられる。1.1 kb PstI断片中の3' PstI部位の上流のHindIIIは終止コドンの下流にあり、従って後記のごとき上流領域の変形の後コード配列をHindIIIカセットとして切り出すことを可能にする。

D.3. DNA配列から決定されるヒトTNFの特徴付け

第1図中に示されるcDNA配列から推定されるように、成熟TNF蛋白質は157個のアミノ酸残基を含有し、そしてグリコシル化を伴わないで約17,354の分子量を有する。リー

ダー配列は、最初の利用可能なMet出発コドンから始まっておよそ76個のアミノ酸を含有する様である。69位及び101位に2個のシステイン残基が存在し、活性構造がジスルフィド結合を含有する可能性を導く。

D.4. 発現ベクターの調製

D.4.a. N-末端コドンの変形

成熟蛋白質の発現を行うために、成熟蛋白質のN-末端バリン(第1図中1として示される)をコードするGTC配列にすぐ先行してATG開始コドンを導入し、そして適当な宿主発現ベクターへの連結のためにATGのすぐ上流にHindIII部位を設けるのが便利であった。これは、C.4項に記載した部位特定変異誘発により達成した。

さらに詳細には、コード配列の上流部分を含有するDNA断片をPstIによりpE4から切り出し、アガロースゲル電気泳動により単離し、電気溶出により回収し、そしてベクターリオファージM13mp18のPstI部位に連結した。

連結されたファージを凍結されたコンピテントE. コリ K12株DG98(ATCC#39768)に形質導入し、そしてシグマ社(セントルイス)から入手したイソプロピルチオガラクトシド(IPTG) 5 × 10⁻⁴ M及び40 µg/mlのX-galを含有する培地上にプレートすることにより培養した。非-α-補完白色ブランクは新たな培地に拾い上げた。予想される(1.1 kb)サイズの挿入部を含有する組換え体単鎖ファージDNAについてミニカルチュアをスクリーニングした。クローン4.1と称する目的とする組換え体ファージの構造を制

制限酵素分析を用いて確認した。

次の配列：

5' - GAAGATGATCTGACCATAAGCTTTGCCITGGGCC - 3'

を有する化学合成され精製された33-マーオリゴデオキシリボスクレオチドを用いて、成熟TNF蛋白質の第1アミノ酸（バリン）をコードするGTCコドンの前にHindIII制限酵素部位及びATG-開始コドンを導入した。

10 pmoleのオリゴスクレオチドを、10 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、20 mM MgCl₂ 及び20 mM β-メルカプトエタノールを含有する混合物15 μl中で、67℃にて5分間及び42℃にて25分間加熱することにより2.6 μgのssクローン4.1 DNAとハイブリダイズせしめた。このアニールされた混合物を氷上で冷却し、そして次に0.5 mMの各dNTP、17 mM Tris-HCl (pH 7.9)、17 mM MgCl₂、83 mM NaCl、17 mM β-メルカプトエタノール、5ユニットのDNAポリメラーゼI Klenow断片を含有する反応混合物25 μlの初期容量に調整し、37℃にて1時間インキュベートした。80℃に加熱することにより反応を停止し、そしてこの反応混合物を用いてコンピテンT DG 98細胞を形質転換し、寒天プレート上にプレートし、そして一夜インキュベートしてファージブランクを得た。

変異したクローン4.1ブランクを含有するプレート、及び変異していないクローン4.1ファージブランクを含有する2枚のプレートを4℃に冷却し、そして寒天プレート上に第1の乾燥フィルターを5分間置き、そして第2のフィルターを

フィルターを空気乾燥し、そして-70℃にて4時間オートラジオグラフ処理した。変異したクローン中に新たなHindIII制限部位を形成するためにオリゴスクレオチドプライマーを選択したので、このプライマーとハイブリダイズした多数のクローンからのRF-DNAをこの制限酵素により消化した。新しいHindIII制限部位を有する変異したクローン4.1ブランクの1つを拾い、そしてDG 98の培養物中に接種し、ssDNAを培養上清から調製し、そしてdsRF-DNAを細胞ペレットから調製した。正しい配列をジデオキシ配列決定法により確認した。

正しく合成された鎖を単離し、そしてPstI及びHindIII（部分的）により、又はHindIIIのみにより開裂せしめて発現ベクターに連結した。

D.4.b. 発現ベクターの造成

原核性発現のため、コード配列（幾らかの3'非翻訳ヌクレオチドと共に）をdsM13-AW701から2つの方法で切り出した。

第1の方法においては、dsM13-AW701をPstIで消化し、そして次にHindIIIで部分消化してHindIII-PstI TNFコード配列を得た。（M13-AW701中には幾つかのHindIII部位が存在するためHindIII部分消化が必要である。）DNA断片の部分消化は、DNAの完全消化のために必要な制限酵素量の1/10を用いることにより行うことができる。混合物をその酵素について適当な温度においてインキュベートし、そして消化混合物のアリコートを一時間毎に1時間まで取り出

25分間置くことによって、各プレートからファージブランクを2枚のニトロセルロースに移した。次に、このフィルターを、0.2 N NaOH、1.5 M NaCl及び0.2%トリトンX-100に浸漬した厚いフィルター上に5分間置き、そして0.5 M Tris-HCl (pH 7.5) 及び1.5 M NaClに浸漬したフィルター上にさらに5分間置くことによって中和した。このフィルターを、2×SSC浸漬したフィルター上で同様に洗淨し、乾燥し、そして真空オーブン中で80℃にて2時間加熱した。2枚のフィルターを42℃にて4時間、フィルター当たり10 mMのDNAハイブリダイゼーション緩衝液（5×SSC、pH 7.0、4×デンハート溶液（ポリビニルピロリドン、フィコール及びウシ血清アルブミン、1×=各0.02%）、0.1% SDS、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0、及び100 μg/ml変性サケ精子DNA）により前ハイブリダイズせしめた。プライマーをラベルされたATPと共にキナーゼ処理することにより³²P-ラベル化プローブを調製した。フィルターを、フィルター当たり1~5 mMのDNAハイブリダイゼーション緩衝液中5×10⁶ cpm/mlの³²P-ラベル化プライマーに64℃にて8時間ハイブリダイズせしめた。

フィルターを室温にて10分間、0.1% SDS、20 mMリン酸ナトリウム（緩衝剤）及び6×SSC中で1回；37℃にて20分間、緩衝剤及び2×SSC中で1回；50℃にて20分間、緩衝剤及び2×SSC中で1回；並びに最後に60℃にて20分間、緩衝剤及び1×SSC中で洗淨した。

した。次に、これらのアリコートをゲルに負荷し、そしてDNA断片を分析した。必要とされるDNA断片の最高収量をもたらした時点を制限酵素による調製消化のために使用し、そして適切な断片を電気泳動によりゲルから精製した。

TNF遺伝子の3'-非コード配列を含有するPstI/BamHI断片を、pE4から、酵素PstI及びBamHIによるDNAの消化の後に精製した。

HindIII/PstI断片及びPstI/BamHI断片は一緒になってコード配列+DNAの600bp 3'非翻訳部分を構成する。2つの断片を次のようにして、HindIII/BamHI消化した宿主ベクターpTRP3に連結した。

pTRP3（下記を参照のこと）はE. コリトリプロモーター及びリボゾーム結合部位を含有する。pTRP3をHindIII及びBamHIで消化し、そしてベクター断片をアガロースゲル上で精製した。次に、単離された断片を上記のHindIII/PstIセグメント及びPstI/BamHIセグメントと共に3方連結により連結し、そしてこの混合物を用いてE. コリMH294をAmp^rに形質転換してpAW701を得た。

第2の方法においては、dsM13-AW701をHindIIIにより消化し、そして遺伝子を含有する断片をアガロースゲル上で単離した。この単離された断片をHindIIIにより開裂されBAPにより処理されたpTRP3に連結し、そしてE. コリMH294に形質転換してpAW702を得た。

PLプロモーター及びバシルス・ポジティブ・レトロレグジュレトリー配列を含有するpPC54.1 (ATCC39789) 又はpPLOP（下

記を参照のこと)を宿主ベクターとして使用することもできる。これらのベクターをHindⅢ及びBamHⅠにより消化し、そして制動配列を含有する大プラスミド断片をアガロース上で精製する。上記のようにして調製したTNF遺伝子のHindⅢ/PstⅠ部分及びPstⅠ/BamHⅠ部分を、3方連結により、これらのベクターのHindⅢ及びBamHⅠ部位に連結してそれぞれプラスミドpAW711及びpAW712を得る。

他の方法として、pE4からの精製されたHindⅢ断片を、HindⅢで開かれBAPで処理されたpFC54.1又はpPLDPに連結してそれぞれpAW713及びpAW714を得る。

D.4.c. 原核性宿主中でのTNFの発現

pAW701及びpAW702をE. コリHM294に形質転換し、そしてtrpプロモーターを抑制する条件下で培養物を増殖せしめる。トリプトファンの枯渇による誘導の後、TNFの生産が開始された。同様にして、pAW711を造成し、そしてE. コリMC1000-39531中に形質転換し、そして細胞を高温により誘導した。誘導条件下で数時間培養した後、細胞を音波処理し、L-929細胞毒性アッセイにより音波処理物がTNFを含有することを確認した。結果は次の通りである。

プラスミド	U/ml
701	1.3×10^4
702	1.3×10^4
711	2×10^5

1NF活性のユニットはB.5.項に定義した通りである。

た。次に、音波処理物をDEAEセファロースカラム(ファルマシア)に適用し、そして緩衝液(10 mM Tris, pH 8.2、1 mM NaCl)により洗浄した。10 mM Tris (pH 8.2)中0.02M、0.04M、0.1M、及び0.8M NaClによる段階的洗出によりTNF活性を含有する画分を得た。

TNF活性のほとんどが0.04M NaClにおいて溶出した。これらの画分を限外濾過により濃縮し、そして次にフェニルTSE-5PWカラム(LKB)を用いるHPLCによりさらに精製した。TNFは0.1Mリン酸ナトリウム(pH 7.0)中1.8M硫酸アンモニウムの存在下でカラムに結合し、そして0にまで低下する硫酸アンモニウム濃度によりカラムを展開した場合約0.4M塩化アンモニウムにおいて溶出した。TNFを含有する画分を限外濾過により濃縮し、そしてGH75サイズ分画カラム(アミコン)に適用して純粋なTNFを得た。

D.5.b. TNFミューテインの分離

等電点電気泳動は、前項に記載したようにして調製されたTNFが5.8~6.5の間の異なるpI値の幾つかの種から成ることを示した。すべての主要な種は予想された成熟TNF(mTNF)であることが示されたが、汚染ミューテイン形V4TNFも存在した。等電点電気泳動ゲルの結果はTNFの多数の変形体が存在することを示した。

調製の規模においてV4TNFからmTNFを分離するため、D.5.項に記載したEDTAセファロースカラムを高度の分画を用いて溶出し、主mTNFピークの溶出の前に、約0.03N NaClにおいてV4TNFが富化された画分を得た。富化

D.4.d. 真核性宿主中でのTNFの発現

前記D.2.d項のcDNAライブラリーから単離されたベクターpB11はTNFコード配列に作用可能に連結されたSV40プロモーターを含有する。28個の陽性にハイブリダイズするコロニーのすべて(特にpE4及びpB11を含む)はこの連結を含有すると予想され、そしてそれ由に適当な哺乳動物宿主中で発現することができる。従って、pB11を用いてCOS-7モンキー腎細胞を形質転換し、そしてこの細胞をSV40プロモーターの誘導を行う条件下で培養した。シグナル配列がpB11中になお存在し、そして哺乳動物細胞系において機能するため、TNFは培地に分泌された。単層を形成したCOS-7細胞上の上清中のTNFをL-929細胞からの³⁵Sの放出によりアッセイし、次の結果を得た。

プラスミド	³⁵ Sの放出(cps)
B11	22,763
E9 (陰性対照)	2,739
-DNA	2,565

D.5. 組換えTNFの特徴付け

D.5.a. 精製

pAW711により形質転換されたE. コリDG95(MC1000-59531に類似するラムダ溶原株)を37℃にて標準的増殖培地中で約0.5のOD₆₀₀に増殖せしめ、そして次に温度を42℃に上昇せしめることにより誘導した。2時間後、細胞を音波処理し、そしてL-929細胞毒性アッセイ(前記)を用いて音波処理物がTNF活性を含有していることを確認し

されたV4TNF画分を濃縮し、そして前記の条件のもとでHPLCのためにフェニルTSE-5PWカラムに適用した。富化された画分のHPLCは上記のように約0.4M硫酸アンモニウムにおいてmTNF含有ピークをもたらし、そして0.1Mホスフェート(pH 7)から脱イオン水への逆グラジエントの場合に溶出する精製されたV4TNFを脱イオン水と共にカラムに適用した。V4TNFピーク画分を濃縮し、そして前記のようにしてGH75上でさらに精製し、ゲル上での等電点電気泳動において5.8のpIを有する均一なV4TNFを得た。

280nmにおける吸収により同定される、前記のGH75精製段階から得られるV4TNFピークを含む画分の比活性を試験した。次の結果が得られた。

画分	蛋白質濃度 (mg/ml)	生物活性 (U/mg)	比活性 (U/mg)
16	0.043	4.7×10^4	1.1×10^6
17	0.091	1.9×10^5	2.1×10^6
18	0.102	1.4×10^5	1.4×10^6
19	0.063	7.0×10^4	1.1×10^6
20	0.035	2.4×10^5	6.9×10^6

純蛋白について予想されるピークにわたって一貫している平均比活性は 1.3×10^6 U/mgである。これはmTNFのそれに比べて約10倍高い。

D.5.c. mTNF及び $\nabla 4$ TNFの確認

2種類のTNFのアミノ酸組成が下記の結果をもって比較された。

アミノ酸	予想組成 (cDNA)	TNF ₁ p15.8-6.5	TNF ₂ p15.8	差 TNF ₁ -TNF ₂
Asx	12	12.7	12.4	0.3
Thr	6	6.2	6.1	0.1
Ser	13	12.6	10.9	1.7
Glx	20	20.5	20.2	0.3
Pro	10	10.1	10.3	-0.2
Gly	11	11.1	11.1	0.0
Ala	13	13.4	13.1	0.3
Val	13	10.9	10.2	0.7
Met	0	0.2	0	0.2
Ile	8	6.5	6.6	-0.1
Leu	17	18.7	18.5	0.2
Tyr	7	6.9	7.0	-0.1
Phe	4	4.0	4.0	0.0
Lys	6	6.1	6.2	-0.1
His	3	3.0	3.0	0.0
Arg	9	9.0	8.0	1.0
n =	152	151.9	147.4	4.5

両蛋白質は組成について比較した場合cDNA配列から予想される組成と合理的に一致するが、しかしながら $\nabla 4$ TN

1.7 mM MgCl₂、8.3 mM NaCl、1.7 mM β -メルカプトエタノール、及び5ユニットのDNAポリメラーゼI Klenow断片を含有する反応混合物の25 μ lの最終容量に調整し、37℃にて1時間インキュベートした。80℃に加熱することにより反応を停止し、そして反応混合物を用いてコンピテントDG98細胞を形質転換し、寒天プレート上にプレートし、そして一夜インキュベートしてファージブランクを得た。

変異したクローンM13-AW701 ブランクを含有するプレート、及び非変異クローンM13-AW701 ファージブランクを含有する2枚のプレートを4℃に冷却し、そして第1の乾燥したフィルターを寒天プレート上に5分間置き、そして第2のフィルターを2.5分間置くことにより各プレートからファージブランクを2枚のニトロセルロースフィルターに移した。次に、これらのフィルターを、0.2 M NaOH、1.5 M NaCl及び0.2 %トリトンX-100中に浸漬した厚いフィルター上に置き、そして0.5 M Tris-HCl (pH 7.5) 及び1.5 M NaClに浸漬したフィルター上に5分間置くことにより中和した。フィルターを同様にして2×SSCに浸漬したフィルター上で2回洗浄し、乾燥し、そして次に真空オーブン中で80℃にて2時間加熱した。2枚のフィルターを42℃にて4時間、フィルター当たり10 mMのDNAハイブリダイゼーション緩衝液〔5×SSC (pH 7.0) 4×デンハート溶液〔ポリビニルピロリドン、フィコール及びウシ血清アルブミン、1×それぞれ0.02%〕、0.1 % SDS、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 及び100 μ g/mlの炭性サケ精子DNA〕

Fは2個のセリン、1個のバリン、及び1個のアルギニン残基を欠いているようであった。N-末端配列からのこれらの残基の除去は自動蛋白質シーケンサー上での $\nabla 4$ TNFの配列決定により確認され、最初の10個のアミノ酸の配列が次のように与えられた。

Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala

この配列と第1図中の推定アミノ酸配列との比較は、この配列が最初の4個のアミノ酸残基Val-Arg-Arg-Serを欠くがこれに続く位置に一致するN-末端配列を有することを示している。

D.6. $\nabla 4$ TNFの遺伝子の調製及びE. コリによるその発現

次の配列:

5'-CACTCGGGGTTTCGAGACATAAGCTTTGCTGGGCC-3'

を有する化学合成された精製された15-マーオリゴデオキシリボヌクレオチドを用いてブルーアウトし、そしてこれによってメチオニン開始コドンから下流の4個のN-末端アミノ酸をコードする12ヌクレオチドを除去した。

10 pmoleのオリゴヌクレオチドを2.6 μ gの α スクロームM13-AW701 DNAに、100 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、20 mM MgCl₂、及び20 mM β -メルカプトエタノールを含有する混合物15 μ l中で、67℃にて5分間及び42℃にて2.5分間加熱することによりハイブリダイズせしめた。アニールされた混合物を氷上で冷却し、そして次に0.5 mMずつのdNTP、1.7 mM Tris-HCl (pH 7.9)、

と前ハイブリダイズせしめた。フィルターを、フィルター当たり1~5 mMのDNAハイブリダイゼーション緩衝液中5×10⁶cpm/mlの³²P-ラベル化プライマーに64℃にて8時間ハイブリダイズせしめた。

フィルターを、室温にて10分間、0.1 % SDS、20 mM リン緩衝ナトリウム (緩衝剤) 及び6×SSC中で1回; 37℃にて20分間、緩衝剤及び2×SSC中で1回; 50℃にて20分間、緩衝剤及び2×SSC中で1回; 及び最後に60℃にて20分間、緩衝剤及び1×SSC中で洗浄した。フィルターを空気乾燥し、そして-70℃にて4時間オートラジオグラフ処理した。

陽性クローンからのRF-DNAをHind IIIで処理し、そして変異したTNFコード配列を含有する断片をゲル電気泳動により単離した。回収された配列をHind III開裂されそしてBAP処理されたpAW711に連結してpAW736を得た。12個のヌクレオチドの除去の存在をHind III及びPvu IIによる制限分析により確認した。pAW711により生成される146bpHind III/Pvu II断片に比べてpAW736は134bp Hind III/Pvu II断片を含有する。pAW736は1985年4月10日にATCCに寄託され、そしてNo.53092の受託番号を有する。

pAW736で形質転換されたE. コリDG95を前記のようにして増殖せしめそして誘導した。音波処理物を前記のようにして調製し、そしてアリコートに12.5 % SDS-PAGEを用いて分析した。 $\nabla 4$ TNFを正確に前記のようにして音波処理物から精製し、そして前に調製した $\nabla 4$ TNFと同一であること

が等電点電気泳動により示された。単離された $\nabla 4$ TNFをL-929細胞毒性アッセイを用いて試験し、そして約 2×10^4 U/mgの比活性を有することが示された。

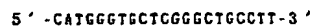
D.7. TNFのその他のミューテインの造成及び活性

D.7.a. 造成

D.6項に前記したのと正確に同様の方法により、第1図に示される配列に比べて最初の3~11個のアミノ酸残基を欠くTNF除去ミューテインを調製した。第3図は得られるベクターの名称、及び除去を生じさせるために使用した部位特異的変異誘発におい使用したオリゴマーを示す。この図はまた、 $\nabla 156$ 、 $\nabla 150$ 、及び $\nabla 140$ -TNF、並びにdes-ser, des-ser, 及びval, ser, ミューテインのベクターの名称及びこれらの造成のために使用したオリゴマーを示す。

ser, 又はser, ミューテイン

同様に、オリゴヌクレオチド指令変異誘発を用いて、TNF活性を有するがしかしcys, が他のアミノ酸に変えられているか又は除去されており、そして/又はcys, が置き換えられているか又は除去されているミューテインをコードする変異TNF遺伝子を得る。cys, からser, への例示的な転換のために好ましいオリゴヌクレオチドプライマーは、



である。このオリゴヌクレオチドはTNF遺伝子のコドン69と対合するトリプレット中にT→Aの変化を有する。同様に、101位のコドンと対合するトリプレットに対応する変化を含むプライマーを用いてcys, をser, に転換する

して上に調製したベクターに入れることにより造成する。

ser, 、ser, 及びser, ser, TNF形をそれぞれプラスミドpAW731、pAW732、又はpAW735から得る。特に、プラスミドpAW731は広範に前記されており、pAW732及びpAW735はser, TNF及びser, ser, TNFをコードし、そして同様に製造される。こうして得られた発現ベクターをE. コリに形質転換し、そして細胞を培養し、そして上記のようにして誘導して目的の蛋白質を得る。得られるTNFミューテインはmTNFに匹敵して活性である。

D.7.b. 他のミューテインの発現

pAW731を担持するE. コリHC1000-3951を増殖せしめそしてD.5.a. 項に記載したようにして高温において誘導した。誘導された細胞からの音波処理物をアッセイし、そしてpAW711形質転換体とおよそ同じmL当りのTNF活性を有することが見出された。しかしながら、SDS分析は、これらの抽出物中の17kD TNF蛋白質の量は約5倍少なく、ser, TNFの比活性は変化していない蛋白質のそれよりも高いことが示された。

後に記載する方法に従って、精製され(95%)た未変性の蛋白質をDTT及びヨードアセテートで処理することにより還元しそしてアルキル化した。未処理の蛋白質は 2.6×10^4 U/mLの活性を有していたが、還元された蛋白質、又は還元されアルキル化された蛋白質は $4.4 \sim 4.8 \times 10^4$ U/mLの活性を有していた。

ことができる。

D.4.a項に記載したようにしてpE4のPst処理により調製されたクローン4.1を、D.4.a項に記載したのと実質上同様であるがしかし次のプライマー:



(これは69位のシステインに隣接する配列に相補的であるがしかしTGCからAGCへの変化を行うコドンに相補的なヌクレオチドを含有する)を用いる部位特定変異誘発にかけた。変異したプライマーを前記のようにして同定しそして配列決定により確認した。目的とする変異を含有する1つのプライマーMB-AW731をAvaI及びPstIで消化し、そしてこの断片をPstI/AvaIで消化したpAW711に連結した。連結混合物をE. コリHC1000-39531に形質転換してAmp^rにし、そしてプライマープローブを用いて形質転換体を正しい配列についてスクリーニングした。pAW731と称する1つのコロニーを変形された配列の発現のために用いた。pAW731は1985年1月25日にATCCに寄託され、そして受託番号No.53007を有する。

同様に、ser, TNFのための発現ベクターであるpAW741を調製した。

システイン-69及び/又はシステイン-101が除去されたTNFミューテインをコードするDNA配列を用いてN-末端又はC-末端が除去されたミューテインを変形して対応する"ダブル"ミューテイン形を得る。これらのミューテインのための発現ベクターを、これらの変形を含有するDNAコード領域のスイッチ部分を適切な制限酵素を用いて断片化

処 理	活 性
No DTT	2.6×10^4
0.1mM DTT	3.3×10^4
1 mM DTT	4.8×10^4
2 mM DTT	3.9×10^4
10 mM DTT	1.2×10^4
20 mM DTT	1.7×10^4
緩衝剤+2.4 mM IAA	1.5×10^4
1mM DTT+2.4 mM IAA	4.4×10^4

pAW711について前記したのと全く類似する方法により、TNFのN-末端除去ミューテインをコードする第3図に記載するプラスミドをE. コリに形質転換し、そして形質転換された細胞を培養し、そして誘導して目的の蛋白質の生産を得た。mTNF及び $\nabla 4$ TNFについて前記したのと同様に、こうして得られた組換え蛋白質を精製しそしてアッセイした。L-929細胞毒性アッセイにおいて、これらのミューテインの比活性は $\nabla 6-8$ TNFを最高とするベル形曲線を示した。これらのミューテインの比活性はmTNFのそれよりも5~10倍高いと算定される。これらの結果を第4図に示す。

さらに、これらのミューテインは、組換え生産の条件下でmTNFよりも均一な形で生産されるようである。これは第5図及び第6図に例示されており、これらはそれぞれ、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動及び等電点電気泳動ゲルにかけられた場合のmTNF及び種々のミューテインの精製された調製物を示す。各図は、pAW711(mTNF)、並びに

それぞれ4, 6, 7, 8, 9, 及び10個のN-末端アミノ酸を欠くpAW736, pAW739, pAW737, pAW740, pAW741及びpAW742の発現生成物についての結果を示す。

第5図において、すべての蛋白質は均一のようであり、調製物が単離された蛋白質のサイズに関して純粋であることを示している。しかしながら、第6図の結果は、pAW711 (mTNF) 発現の生成物がpI値を異にする蛋白質の混合物であることを示し、従って一次配列の側鎖の変形を示している。pAW736の生成物は変形した側鎖を有する少量の蛋白質を含有するようであるが、その他のプラスミドの発現生成物はきれいなようである。

D.8 インビボアッセイの結果

組換え生産されたmTNF (rTNF) はB.5.b.項に前記したインビボアッセイにおいて活性であった。第7a図及び第7b図は、ネズミの縦横肉腫及びの増殖及び宿主の生存に対するrTNFの0.5, 1.0及び2.0 μ gの注射の効果を示す。これらのアッセイにおいて、TNFの各示された投与レベルは個々の注射当たりの量を示す。注射は腫瘍を移植した後9日に開始し、そして1日おきに合計6回の注射の間継続した。第7a図は、TNF注射の開始を示す0時点から始まる腫瘍の増殖に対するTNFの効果を示す。底線にそう矢印は投与時を示す。これらの結果は、静脈内投与された6 \times 0.5 μ gのrTNFさえ、対照と比較して腫瘍体積の有意な増加を防止することを示している。第7b図は、TNF注射の最終日としての0時点（すなわち第7a図の10日目）か

において高コピー数の複製が生ずるが、しかし低温においては低コピー数の複製が生ずる。

pOP9は全温度において高コピー数のプラスミドであり、このものはCol E1タイプのプラスミドpOP6 [Gelfand, D. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1978) 75: 5869] からのEcoRI/Pvu II 開始点含有断片をpBR322に挿入することにより造成された。挿入前に、この断片は次のようにして変形された。50 μ gのpOP6を20ユニットずつのBamHI及びSst Iにより完全消化した。Sst I 3' 突出末端を除去しそしてBam 5' 末端をフィルインするため、消化されたpOP6 DNAをE. コリDNAポリメラーゼ I (Klenow) により、まず3' Sst I 突出末端を除去するために20℃における、及び次に5' 末端を修復するために9℃における2段階反応において処理した。平滑末端断片を消化しそして0.02 pmoleを使用してコンピテント D G 7 5 (O' Farrell, P. 等, *J. Bacteriology* (1978) 134: 645-654) を形質転換した。形質転換体を50 μ g/mlアンピシリンを含有するLプレート上で選択し、そして3.3 kbの除去、Sst I 部位の喪失、及び新たに形成された BamHI 部位の存在についてスクリーニングした。

pOP7 と称する1つの候補を選択し、そして25 μ gのpOP7を20ユニットのBamHIで消化し、E. コリDNAポリメラーゼ I 断片 (Klenow) で修復し、そしてT4 DNAリガーゼにより再連結することによりBamHI 部位を除去した。コンピテント D G 7 5 を0.1 μ gのDNAで処理し、そして形

ら始まる生存率を示す。この結果は生存率(%)が3投与レベルのすべてにおいて劇的に改良されることを示している。

MCF-7 腫瘍を移植されたマウスにおいて、腫瘍移植後7日に静脈内TNF注射を始めた。第1の注射(2 μ g)は毒性であり(10マウス中5マウスが死亡)、そして合計5回の追加の間1日おきに行われたその後の注射は、1 μ g/マウスで行った。マウスにはさらに、1 μ gのエストラジオールを筋肉内に0日、2日、4日、7日、9日及び11日目に注射した。14日間にわたり、TNFを注射されたマウスの腫瘍体積は30 mm^3 から50 mm^3 にわずかに増加したが、対照のそれは30 mm^3 から130 mm^3 に増加した。

D.9. pPLOPの造成

pPLOP は1984年12月18日にATCCに寄託され、そして受託番号No.39947を有する。その造成を下に記載する。

D.9.a. 複製開始点

pCS3は高温においてpPLOP宿主ベクターの高コピー数をもたらす複製開始点を提供する。その造成は1983年10月14日に出版された米国特許出願No.541,948 に広範に記載されている(これを引用によりこの明細書に組み入れる)。pCS3は1982年6月3日に寄託されており、そして受託番号 ATCC No.39142を有する。

pCS3は pEW27及び pOP9 に由来する。pEW27 はE.M. Wong, *Proc. Natl. Sci. (USA)* (1982) 79: 3570に記載されている。このものはその複製開始点の近傍にコピー数の温度制御をもたらす変異を含有する。これらの変異の結果として、高温に

質転換体を50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLプレート上で選択した。候補をBamHI 制限部位の喪失についてスクリーニングした。pOP8を選択した。pOP9を得るため、pBR322からのAvaI (修復)/EcoRI Tet^r 断片を調製し、そして単離し、そしてpOP8からの単離された Pvu II (修復)/EcoRI 3560bp 断片に連結した。

1.42 kb EcoRI / AvaI (修復) Ter^r (断片A) と3.56 kb EcoRI / Pvu II Amp^r (断片B) の連結は EcoRI 末端の分子間連結を促進するため2段階反応において0.5 μ gの断片B及び4.5 μ gの断片Aを用いた。

コンピテント D G 7 5 を5 μ gの連結混合物で形質転換し、そして形質転換体をアンピシリン(50 μ g/ml) 含有プレート上で選択した。Amp^r Tet^r 形質転換体から単離されたpOP9は、高コピー数、コリシン耐性、EcoRI, BamHI, Pvu II 及びHind III のための1個の制限部位、Binc II のための2個の制限部位、並びに適切なサイズ及び Hae III 消化パターンを示した。

pCS3を得るため、50 μ gのpEW27 DNAをPvu II 及びEcoRIにより完全消化した。同様に、50 μ gのpOP9をPvu II 及びEcoRIにより完全消化し、そして3.3 kb断片を単離した。

0.36 μ g (0.327 pmole) のpEW27 断片及び0.35 μ g (0.16 pmole) のpOP9断片を連結し、そしてE. コリ KM 294を形質転換するのに用いた。Amp^r Tet^r 形質転換体を選択した。好結果のコロニーをまず30℃及び41℃において β -ラクターマ

ーゼアッセイプレート上でスクリーニングし、そして次に30℃及び41℃における増殖の後にプラスミドDNAレベルについてスクリーニングした。pCS3と称する好結果の候補を配列決定により確認した。

D.9.b. P_L N_{ass} 挿入部の調製

P_L ファージプロモーター及びN-遺伝子(N_{ass})のためのリボゾーム結合部位を含有するDNA配列をpPC5から、そして最終的にShimatake 及びBosenberg, Nature (1981) 292: 128 により掲載されたpKC30 の誘導体から得た。pKC30 はpBR322からのHindIII/BamHIベクター断片中にクローン化されたラクダファージからの2.34 kb断片を含有する。P_L プロモーター及びN_{ass} はpKC30中 BglII及び HpaI部位間を占める。pKC30 はEcoRI部位に転換された BglII部位を有する。

P_L プロモーターにすぐ先行する BglIIを次のようにしてEcoRI部位に転換した。pKC30 を BglIIにより消化し、Klenow及びdNTPで修復し、そしてT4リガーゼによりEcoRIリンカー(ニューイングランド ビオラプスから入手)に連結し、そしてE. コリ K12株MM294 ラムダ⁺に転換した。プラスミドをAmp^r Tet^r 形質転換体から単離し、そして所望の配列を制限分析及び配列決定により確認した。生じたプラスミドpFC3をPvuI及びHpaIにより2重消化して約540 bpの単離された断片を得、そしてKlenow及びdATPで処理し、次にS1スクリーナーで処理して3'末端配列-AGGAGAA(-AGGAGA部分はN_{ass}である)を有する平滑末端断片を生

成せしめた。この断片をEcoRIで制限処理して5'-EcoRI(接着末端)及びHinfI(部分修復、S1平滑)-3'末端を有する347塩基対DNA断片を得る。

pFC5を完成するため、pβI-215を用いてN_{ass}の3'にHindIII部位を形成した。pβI-215は1984年1月13日にATCC №39578として寄託された。これは、ATG+lacZに融合したβ-I FNの140bpを含有する配列をpBR322に融合せしめることによって調製された。pβI-215においては、pBR322のEcoRI部位が維持されており、そして挿入部はβ-I FNのATG開始コドンにすぐ先行するHindIII部位を含有する。pβI-215をHindIIIで制限処理し、Klenow及びdNTPで修復し、そして次にEcoRIにより消化した。生じたEcoRI/HindIII(修復)ベクター断片を上記のEcoRI/HinfI(修復)断片に連結し、そして連結混合物を用いてMC1000-39531を形質転換した。好結果の造成物を含有する形質転換体を、ラクトース最少培地上で34℃にて増殖するが30℃にて増殖しない能力により同定した。(形質転換体を30℃及び34℃においてX-gal-Ampプレート上に、並びに30℃及び34℃において最少ラクトースプレート上にプレートした。適切な造成物を有する形質転換体は両温度においてX-gal-Ampプレート上で青色であるが、最少ラクトース培地上では34℃においてのみ増殖する。)良結果の造成物をpFC5と称した。

D.9.c. pPLOPの完成

次に、P_L及びN_{ass}制限配列を設けるためにpCS3を變形した。pCS3をHindIIIで消化し、そして次にEcoRIで消化した。

ベクター断片をP_L N_{ass}を含有するpFC5からの単離されたEcoRI/HindIIIと連結し、そしてE. コリMM294に形質転換した。単離されたプラスミドDNAの正しい構成を制限分析及び配列決定により確認し、そしてプラスミドをpPLOPと命名した。

D.10. pTRP3の造成

pTRP3は1984年12月18日にATCCに寄託され、そして受託番号№39946を有する。この造成は次の通りである。

HindIII部位の後にtrp制御配列を含有する宿主ベクターを造成するため、アテヌエーター領域を欠くtrpプロモーター/オペレーター/リボゾーム結合部位配列を、スタンフォード大学C. Yanofsky から入手したpVH153から得た。trp配列は当業界においてよく知られた種々のプラスミドから得られる。pVH153をHhaI(これは、露出された3'接着末端を残してtrpプロモーターのちょうど5'を切断する)により処理し、Klenowにより平滑末端化し、そしてTagIにより部分分解した。trpリーダーのATG開始コドンに先行する6ヌクレオチドであるTagI部位における制限に対応する99bp断片を単離し、そして次にEcoRI(修復)/ClaI消化されたpBR322に連結してpTRP3を得た。

下記のプラスミドがアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビル、MD、米国(ATCCに寄託された。これらの寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタベスト条約及びその規則(ブタベスト条約)の規定のもとになされた。これは、寄託の日から30年間にわたる生存培

養物の維持を保証する。これらの生物は、ブタベスト条約に基き、そして該当する米国特許が発効した後に無制限の入手可能性を保証する出願人とATCCとの合意に従って、ATCCから入手可能にされるであろう。寄託された菌株の入手可能性は、いずれかの政府の権威のもとにその特許法に従って与えられた権利を侵害して発明を実施する許諾であると解釈してはならない。

プラスミド	CHCC No	ATCC No	寄 託 日
pE4/ <u>E. coli</u> MM294	2318	39894	1984 年 10月 15 日
pAW711/ <u>E. coli</u> DG95	2162	39918	1984 年 11月 8 日
pAW736/ <u>E. coli</u> DG95	2317	53092	1985 年 4月 10 日
pAW742/ <u>E. coli</u> DG95	2345	53161	1985 年 6月 21 日
pAW741/ <u>E. coli</u> DG95	2344	53162	1985 年 6月 21 日
pAW739/ <u>E. coli</u> DG95	2342	53163	1985 年 6月 21 日
pAW737/ <u>E. coli</u> DG95	2340	53164	1985 年 6月 21 日
pAW740/ <u>E. coli</u> DG95	2343	53165	1985 年 6月 21 日
pAW731/ <u>E. coli</u> DG95		53007	1985 年 1月 25 日

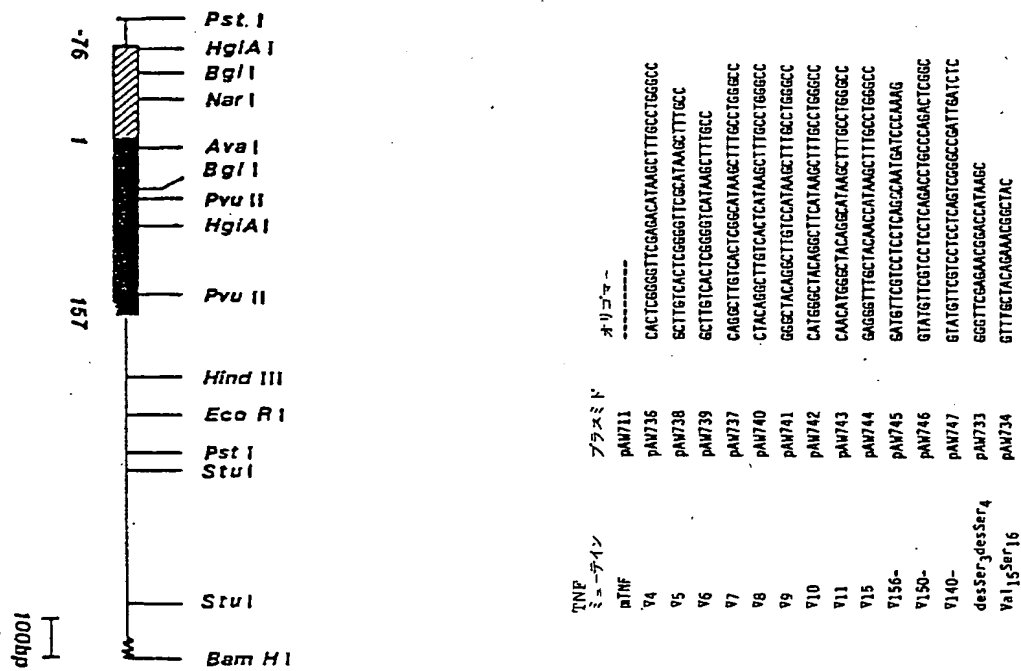


FIG. 3

FIG. 4

TNFミューテイン対照pAW711の相対生物活性

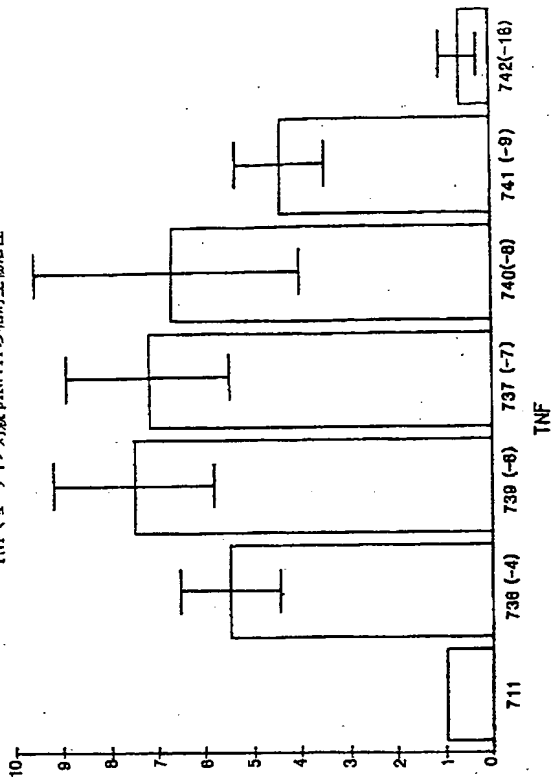


FIG. 5

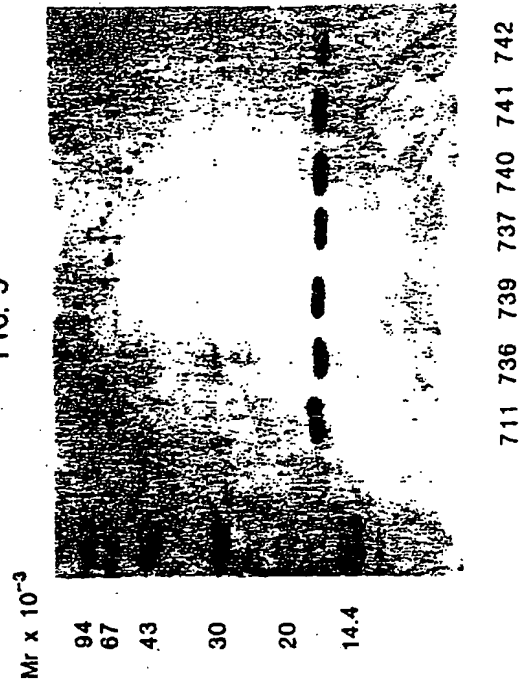
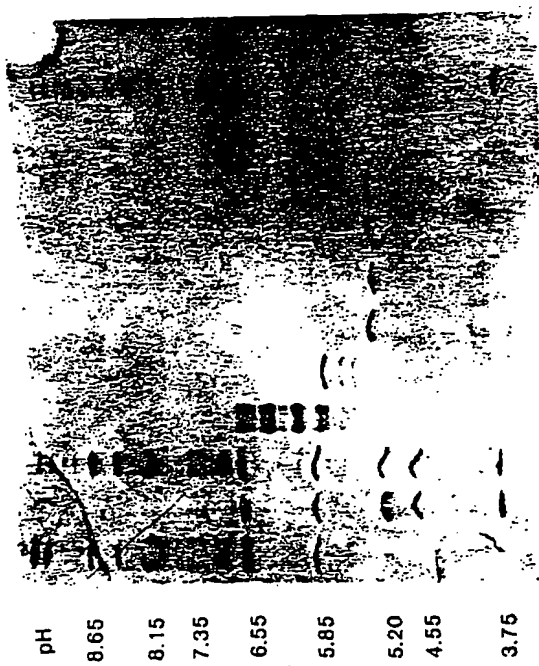


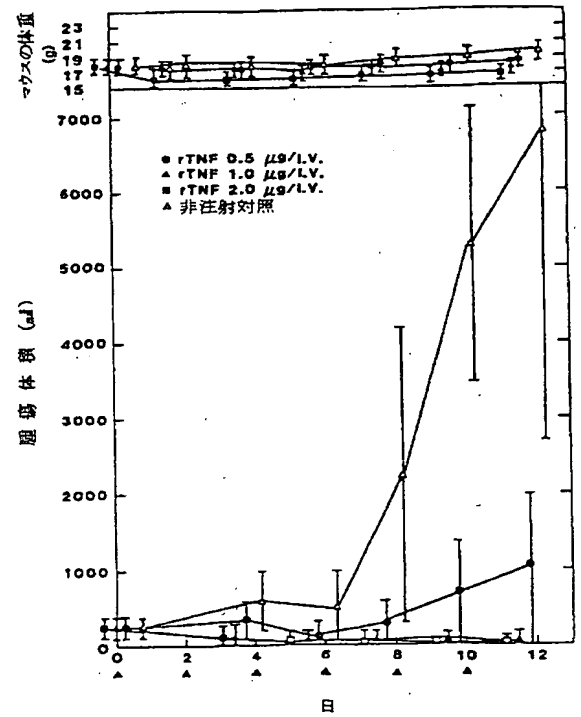
FIG. 6



711 736 739 737 740 741 742

FIG. 7a

効果: rTNF, 9日目から,
ネズミの繊維肉腫



手 続 補 正 書 (方式)

特許庁長官 黒田 明雄 殿

P C T / U S 8 5 / 0 1 9 2 1

ヒト腫瘍壊死因子

事件との関係 特許出願人

4. 代理人

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

(外 4 名) 印 士

昭和61年12月23日（発送日）

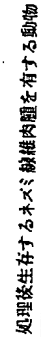


FIG. 7b

(1) 明細書及び請求の範囲の翻訳文

7. 補正の内容

(2) 別紙の通り

(4) 明細書及び請求の範囲の翻訳文 各 1 通

(2) 委任状及びその翻訳文 各1通

Form PCT/ISA/D10 (120000 mod) (January 1993)

International Application No. PCT/US 85/01921

ALL DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, title, inventor, where known, of the relevant passages	Relevant to Class No.
P, X	Nucleic Acids Research, volume 13, no. 17, Oxford, (GB) G. Medwin et al.: "Human lymphotoxin and tumor necrosis factor gene structure, homology and chromosomal localization" see pages 6361-6377	8-10, 15-19
P, X	EP, A, 0155549 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL) 25 September 1985, see claims 1-61	1-3, 6, 8-10, 15-19
P, X	EP, A, 0148111 (ASAKI KASEI KOGYO) 17 July 1985, see pages 29-60; figures	1, 5, 8, 12, 15-17
P, X	Biological Abstracts/RRM, 12 April 1985, Philadelphia, (US) A.M. Wang et al.: "Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor", see page 149, abstract no. 28088615 A DNA 1985, volume 4, no. 1, page 72	1

Form PCT (EA/EE) (LARGE PRINT) (January 1985)

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/US 85/01921 (SA 10982)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 04/02/86

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0155549	25/09/85	JP-A- 60185799	21/09/85
		AU-A- 3944885	12/09/85
		JP-A- 60232097	18/11/85
EP-A- 0148111	17/07/85	JP-A- 60137292	20/07/85
		JP-A- 60221092	05/11/85

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

第1頁の続き

⑨Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 13/00		8318-4H
C 12 N 15/00		7115-4B
// C 12 N 1/20		7115-4B
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:19)		

優先権主張 ②1984年11月9日③米国(US)⑥670360
③1985年5月2日③米国(US)⑥730696
③1985年7月30日③米国(US)⑥760661

②発明者	ワング, アリス エム	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94596, ウォールナット クリーク, プロビデンス コート 2423
②発明者	ラドナー, マサー ビー	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94804, リッチモンド, バレツト アベニュー 2800
②発明者	クリーセイ, アブラ エー	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94611, ビードモント, ランドン コート 8
②発明者	リン, レオ エス	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94539, フリーモント, ロスビノス ストリート 40880
②発明者	バー アレスデル, ジャネル エス	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94804, リッチモンド, サーティファースト ストリート 519

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.